F 1330

04

studii şi cercetări de biochimie

1

TOMUL 14

1971

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 14, nr. 1, p. 1—118, Bucureşti, martie, 1971

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România;
M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacție:

VICTOR GHEȚIE

Revista apare de 4 ori pe an.

Prețul unui abonament anual este de 80 lei.

În țară abonamentele se fac la oficiile poștale, agențiile poștale, factorii poștali și difuzorii voluntari din întreprinderi și instituții.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se fac prin Întreprinderea de comerț exterior—LIBRI, Căsuța poștală 134—135 (Calea Victoriei 126), București, România, sau prin reprezentanții săi din străinătate.

Manuscrisele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență se vor trimite pe adresa comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie".

ADRESA REDACȚIEI:
București, str. Docenților, nr. 20
Sectorul I

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
BIOCHIMIE

Tomul 14, nr. 1 1971

SUMAR

Pag.

L. BOTOŞĂNEANU, S. VASU, Acizii nucleici din plantulele de mazăre (*Pisum sativum*) crescute la întuneric şi în regim de lumină-întuneric . . . 5

L. BUZILĂ, Răspunsul în anticorpi al iepurilor imunizaţi cu albumină serică umană după o dietă colesterolică 13

I. CORNOIU, Ionii de potasiu, calciu şi sodiu în sucurile frunzelor stimulate electric 17

A. DUMITRIU, I. KIŢULESCU, Aplicarea cromatografiei de filtrare moleculară pe Sephadex la determinarea greutăţii moleculare a unor glicoproteine din ţesuturi tumorale obţinute în urma acţiunii stimulatoare a mediatorilor chimici 23

V. GHEŢIE, D. ONICĂ, Gradul eterogenităţii lanţurilor uşoare ale imunoglobulinelor evidenţiat prin metoda focalizării izoelectrice 33

G. LĂZĂRESCU, V. EŞANU, Sistem informaţional modern în domeniul biochimiei 39

C. IORDACHE, Ribonucleazele din muşchi în seria vertebratelor 49

A. MIHĂESCU, Cantitatea şi concentraţia sucurilor obţinute din frunze de porumb, precum şi din fructe de măr, păr şi gutui încălzite la temperaturi ridicate 57

F. MOSORA, Potenţialul de acţiune şi starea apei nervului de broască în cazul acţiunii dinitrofenolului 63

M. RABEGA, Eliberarea proteinelor din biostructura unor frunze sub acţiunea inhibitorilor metabolici 79

M. ŞERBAN, Activitatea specifică în funcţie de pH şi comportarea la inhibiţia termică şi cu uree a malatdehidrogenazei din creier în seria vertebratelor 85

M. ŞERBAN, D. COTARIU, Biochimia comparată a izoenzimelor. XI. Izoenzimele malatdehidrogenazelor şi lactatdehidrogenazei din muşchiul neted la unele specii de vertebrate 93

J. WINTER, M. SIMIONOVICI, N. BOEŞTEANU, Y. CRISTESCU, E. TUCICOV, M. TOCUŞANU, I. A. MOLNAR, Acţiunea fosfolipidelor totale din *Hellianthus annuus* L. asupra metabolismului lipidic la şobolani . . . 99

RECENZII 111

St. cerc. biochim., tomul 14, nr. 1, p. 1—118, Bucureşti, martie, 1971

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
BIOCHIMIE

Tome 14, nr. 1 1971

CONTENTS

Page

L. BOTOŞĂNEANU, S. VASU, Nucleic acids in pea (*Pisum sativum*) seedlings grown in the dark and in the lightdark regimes 5

L. BUZILĂ, The antibodies response of the immunized rabbits with human serum albumin after a cholesterol diet 13

I. CORNOIU, Potassium, calcium and sodium in saps of electrically stimulated leaves 17

A. DUMITRIU, I. KIŢULESCU, Application of molecular filtration chromatography on Sephadex for the determination of molecular weight of some tumoral glycoproteins, obtained following the stimulatory action of chemical mediators 23

V. GHEŢIE, D. ONICĂ, Extent of immunoglobulin light chains heterogeneity revealed by isoelectric focussing 33

G. IORDACHE, Muscle ribonucleases in the scale of vertebrates 39

G. LĂZĂRESCU, V. EŞANU, A modern informational system in biochemistry 49

A. MIHĂESCU, Amount and concentration of saps obtained from maize leaves and from apple, pear and quince fruits heated at high temperatures 57

F. MOSORA, Action potentials and water state in frog nerves, under the action of dinitrophenol 63

M. RABEGA, The release of proteins from the biostructure of some leaves under the action of metabolic inhibitors 79

M. ŞERBAN, The specific activity in terms of pH, as well as the behaviour with respect to thermal and urea inhibition of brain malate dehydrogenase in the scale of vertebrates 85

M. ŞERBAN, D. COTARIU, Comparative biochemistry of isoenzymes. XI. Malate dehydrogenase and lactate dehydrogenase isoenzymes in smooth muscles from several vertebrate species 93

J. WINTER, M. SIMIONOVICI, V. BOEŞTEANU, Y. CRISTESCU, E. TUCICOV, M. TOCUŞANU, I. A. MOLNAR, The influence of total phospholipids from Hellianthus annuus L. on the lipid metabolism in rats 99

BOOK REVIEWS 111

St. cerc. biochim., tomul 14, nr. 1, p. 1—118, Bucureşti, martie, 1971

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 1, 5–12, (1971)

ACIZII NUCLEICI DIN PLANTULELE DE MAZĂRE (*PISUM SATIVUM*) CRESCUTE LA ÎNTUNERIC ŞI ÎN REGIM DE LUMINĂ-ÎNTUNERIC

LILICA BOTOŞĂNEANU şi S. VASU

Rezumat. — S-au extras cu fenol şi s-au fracţionat prin electroforeză în gel de agaroză AN din diferitele organe ale plantulelor de mazăre după 2, 5 şi 9 zile de la germinare, crescute în întuneric şi în regim de lumină — întuneric. S-a constatat că :
— ARN_r din mazărea germinată şi crescută în regim de lumină-întuneric sînt mai eterogeni decît cei din mazărea germinată şi crescută la întuneric, care, în schimb, prezintă fracţiile majore mai bine individualizate ;
— deosebirile de la nivelul ARN_r din diferitele organe apare în primele zile de la germinare şi se estompează ulterior ;
— ARN_r de greutate moleculară mare din frunze migrează în gelul de agaroză mai puţin decît cei din tulpini, rădăcini şi cotiledoane ;
— regimul de iluminare al plantulelor pare să nu aducă modificări la nivelul ARN_s.

Se ştie că, atît la algele verzi, cît şi la plantele superioare, lumina influenţează creşterea, producînd modificări în sinteza proteinelor şi în metabolismul acizilor nucleici (AN). Astfel, Giles şi Myers [1] şi Bulko şi Vecker [2] au arătat că lumina continuă exercită în timpul germinării şi în primele zile de creştere o acţiune inhibitoare reversibilă asupra creşterii plantelor, a sintezei acizilor ribonucleici (ARN) şi dezoxiribonucleici (ADN) din lupin, iar Sokawa şi Hase [3] asupra sintezei ADN, în anumite condiţii de viaţă, la *Chlorella*. Pe de altă parte Williams şi Novelli [4], [5] au constatat la porumb, fasole şi floarea-soarelui că lumina aplicată un timp limitat stimulează, la nivelul ribozomilor, acţiunea de încorporare *in vitro* a aminoacizilor, iar Nego şi Jagendorf [6] au stabilit că lumina, aplicată un timp scurt, induce creşterea şi maturizarea plastidelor la fasolea crescută în întuneric. Seminţele supuse iluminării cu lumină albă răspund diferit, prin inducerea sau inhibarea germinării, în funcţie de specie şi de intensitatea luminii [7].

La mazăre, în cursul germinării şi în primele zile de creştere, van Parys [8] şi Barker şi Douglas [9], urmărind modificările cantitative ale ARN, ADN şi proteinelor, au arătat că se produc modificări cantitative marcante ; cantitatea de AN din cotiledoane (per plantă) scade, iar cea din organele plantulei creşte (în special în frunze şi tulpini). Într-o lucrare anterioară [10] am arătat că, după germinare, între diferitele organe ale mazărei (frunze, tulpini, rădăcini şi cotiledoane) apar anumite diferenţe la nivelul acizilor ribonucleici ribozomali (ARN_r), evidenţiaţi prin electroforeza pe agaroză.

Cum o bună parte din experiențele efectuate atît de noi, cît și de alții folosesc semințele germinate de mazăre, ne-am propus să urmărim dacă în cursul germinării și în primele zile de creștere la întuneric și în regim de lumină-întuneric se produc modificări la nivelul diferitelor forme moleculare de acizi nucleici.

MATERIAL ȘI METODE

S-a lucrat cu semințele hibridului de mazăre F 53/54 (I.C.C.P.P. — Fundulea). Pentru ca germinarea să fie uniformă, semințele au fost înmuiate 4 — 6 ore în apă de robinet, după care au fost ținute în cutii Petri pe hîrtie de filtru continuu umezită, la temperatura de 22 — 26°C.

Unele semințe au fost ținute la întuneric în tot cursul procesului de germinare, iar plantulele formate au continuat să crească tot în regim de întuneric constant, iar la altele s-a aplicat un regim de lumină-întuneric atît în cursul germinării, cît și ulterior.

S-au extras AN din axul embrionar și cotiledoanele de mazăre după 2 zile și din frunze, tulpini, rădăcini și cotiledoane după 5 și 9 zile de la germinare. Menționăm că în experiențele cu mazăre crescută la întuneric timp de 5 zile s-au extras AN din frunze plus tulpini, rădăcini și cotiledoane.

Extracția AN s-a efectuat la rece în tampon TRIS-HCl (0,005 M, TRIS + 0,05 M NaCL + bentonită), pH = 7,6 și sodiu dodecilsulfat 1%, în proporție de circa 10 ml pentru 1 g de material vegetal. Deproteinizările cu fenol 90% — 8-hidroxichinolină 0,1%, precum și prelucrarea extractului apos care conținea AN, s-au efectuat în condițiile menționate într-o lucrare anterioară [11].

Electroforeza AN s-a efectuat în gel de agaroză, după indicațiile date de McIndoe și Munro [12], după cum s-a arătat în aceiași lucrare anterioară [11].

Curbele densitometrice ale electroforeogramelor au fost stabilite cu densitometrul C.R.I — 65 („Carl Zeiss" — Jena).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Prezentăm în figura 1 electroforeogramele și în figura 2 curbele densitometrice obținute pentru AN extrași din plantulele de mazăre crescute la întuneric (nr. 1 — 9), respectiv din cele crescute în regim de lumină-întuneric (nr. 10 — 19).

După cum reiese din figura 1, în toate electroforeogramele sînt prezente diferitele specii moleculare „stabile" de AN, reprezentate de ADN, ARN_r și ARN_s; localizarea pe electroforeograme a acestor specii moleculare de AN am arătat-o într-o lucrare anterioară [10].

. Comparînd electroforeogramele și curbele lor densitometrice obținute pe plantule de mazăre crescute la întuneric cu cele crescute la lumină-întuneric, se constată diferențe la nivelul ARN_r. ARN_r extrași din organele plantulelor crescute la întuneric prezintă, în general, două fracțiuni bine conturate, care dau în curbele densitometrice două piscuri pronunțate

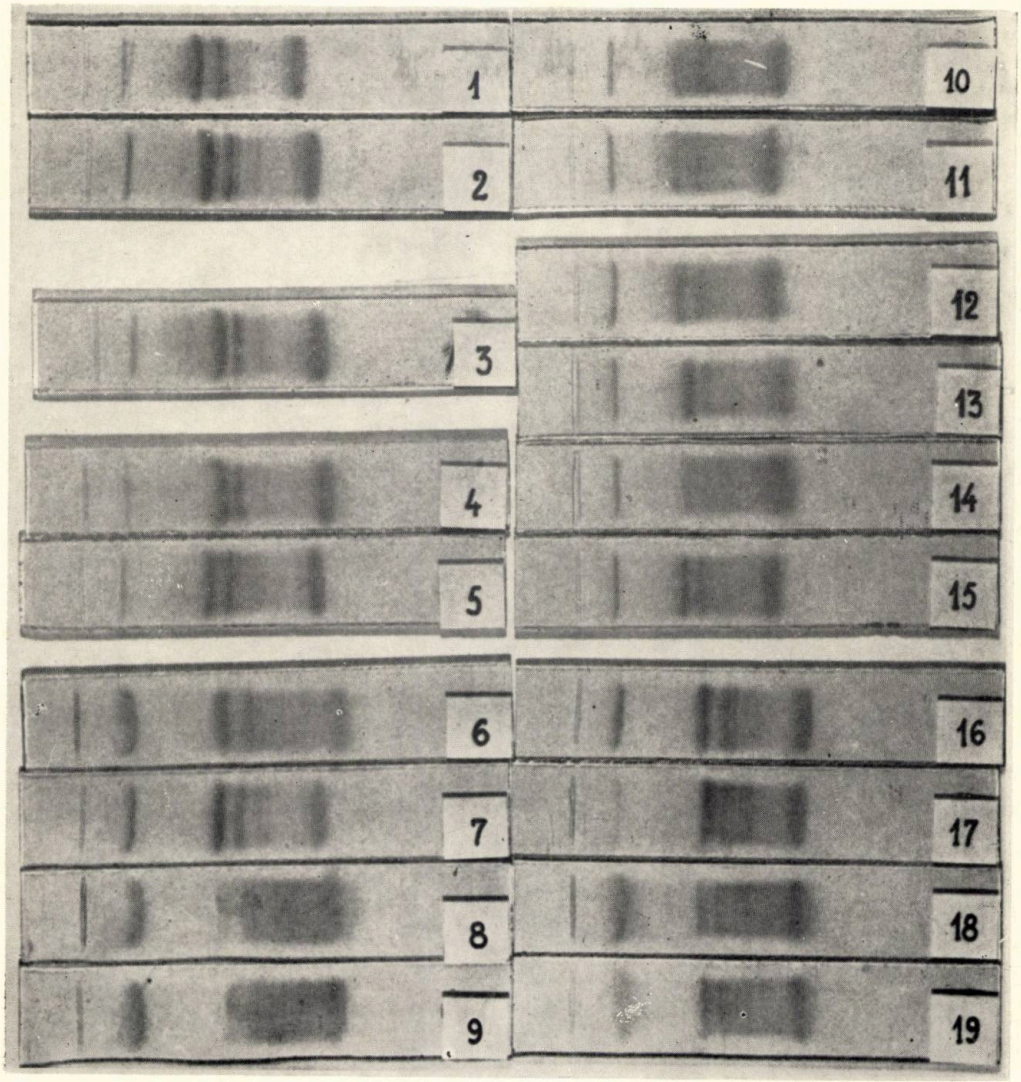


Fig. 1. — Electroforeogramele AN extraşi din diferitele organe de mazăre germinată şi crescută la întuneric (nr. 1 — 9) şi în regim de lumină-întuneric (nr. 10—19):

după 2 zile la întuneric: *1* — ax embrionar; *2* — cotiledoane; după 5 zile la întuneric: *3* — frunze plus tulpini; *4* — rădăcini; *5* — cotiledoane; după 9 zile la întuneric: *6* — frunze; *7* — tulpini; *8* — rădăcini; *9* — cotiledoane; după 2 zile în regim de lumină-întuneric: *10* — ax embrionar; *11* — cotiledoane; după 5 zile în regim de lumină-întuneric: *12* — frunze; *13* — tulpini; *14* — rădăcini; *15* — cotiledoane; după 9 zile în regim de lumină-întuneric: *16* — frunze; *17* — tulpini; *18* — rădăcini; *19* — cotiledoane.

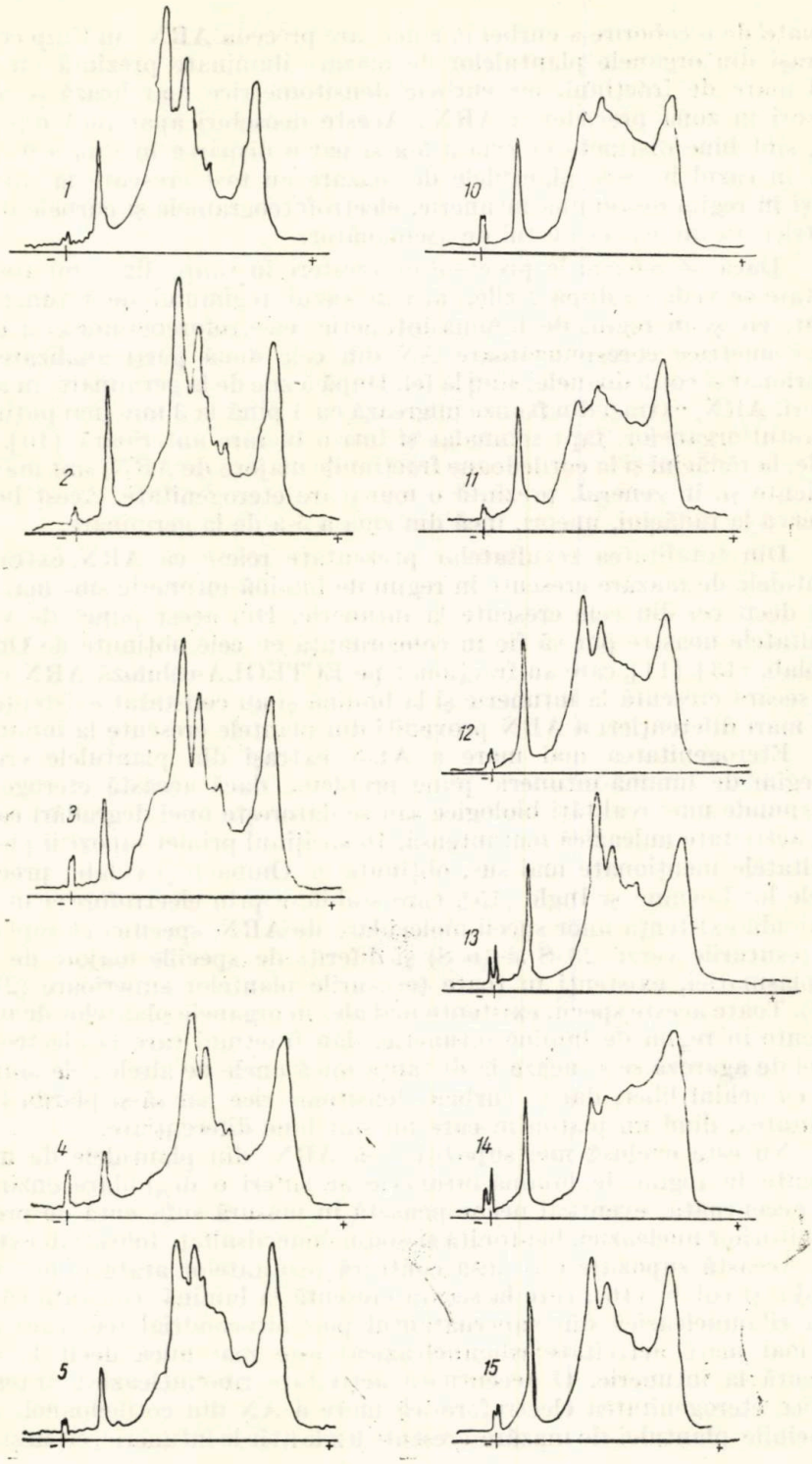
urmate de o coborîre a curbei în zona care precedă ARN_s, în timp ce ARN_r extrași din organele plantulelor de mazăre iluminate prezintă un număr mai mare de fracțiuni, iar curbele densitometrice marchează o serie de piscuri în zona precedentă ARN_s. Aceste deosebiri apar încă din ziua a 2-a, sînt bine distincte în ziua a 5-a și par a dispărea în ziua a 9-a, cînd, atît în cazul în care plantulele de mazăre au fost crescute la întuneric, cît și în regim de lumină-întuneric, electroforeogramele și curbele densitometrice au un aspect destul de asemănător.

Dacă ne referim la procesul de creștere în timp, din rezultatele prezentate se vede că după 2 zile, atît în cazul regimului de întuneric constant, cît și în regim de lumină-întuneric, electroforeogramele și curbele densitometrice corespunzătoare AN din cele două părți analizate (axul embrionar și cotiledoanele) sînt la fel. După 5 zile de la germinare, în ambele cazuri, ARN_r extrași din frunze migrează cu 1 pînă la 3 mm mai puțin decît la restul organelor, fapt semnalat și într-o lucrare anterioară [10]. După 9 zile, la rădăcini și la cotiledoane fracțiunile majore de ARN_r sînt mai puțin evidente și, în general, prezintă o mai mare eterogenitate. Acest lucru se observă la rădăcini, uneori, încă din ziua a 5-a de la germinare.

Din totalitatea rezultatelor prezentate reiese că ARN_r extrași din plantulele de mazăre crescute în regim de lumină-întuneric sînt mai eterogeni decît cei din cele crescute la întuneric. Din acest punct de vedere, rezultatele noastre par să fie în concordanță cu cele obținute de Ombach și colab. [13], [14], care au fracționat pe ECTEOLA-celuloză ARN extrași din secara crescută la întuneric și la lumină și au constatat existența unei mai mari diferențieri a ARN proveniți din plantele crescute la lumină.

Eterogenitatea mai mare a ARN extrași din plantulele crescute în regim de lumină-întuneric pune problema dacă această eterogenitate corespunde unei realități biologice sau se datorește unei degradări cauzate de o activitate nucleazică mai intensă. În sprijinul primei supoziții pledează rezultatele menționate mai sus, obținute de Ombach și colab., precum și datele lui Loening și Ingle [15], care stabilesc prin electroforeza în poliacrilamidă existența unor specii moleculare de ARN_r specifici cloroplastelor din țesuturile verzi (23 S și 16 S) și diferiți de speciile majore de ARN_r citoplasmatici, existenți în toate țesuturile plantelor superioare (25 S și 18 S). Toate aceste specii, existente mai ales în organele plantelor de mazăre crescute în regim de lumină-întuneric, dau fracțiuni care la electroforeză în gel de agaroză se situează la distanță mică unele de altele; ele sînt vizibile cu ochiul liber, dar în curbele densitometrice par să-și piardă individualitatea, dînd un platou în care nu sînt bine diferențiate.

Nu este exclusă nici supoziția că ARN din plantulele de mazăre crescute în regim de lumină-întuneric ar suferi o degradare enzimatică mai accentuată, eventual necompensată în măsură suficientă de prezența inhibitorilor nucleazici, bentonită și sodiu dodecilsulfat, folosiți în extracția AN. Această supoziție este însă contrară rezultatelor arătate de Galaszewski și colab. [16], care la secara crescută la lumină constată că acțiunea ribonucleazică din supernatantul postmitocondrial (cel care deține cea mai mare activitate ribonucleazică) este mai mică decît la secara crescută la întuneric. O accentuată activitate ribonucleazică ar putea să explice eterogenitatea electroforetică mare a AN din cotiledoanele și din rădăcinile plantulei de mazăre crescute 9 zile atît la întuneric, cît în și regim


1
10
2
11
12
3
13
4
14
5
15

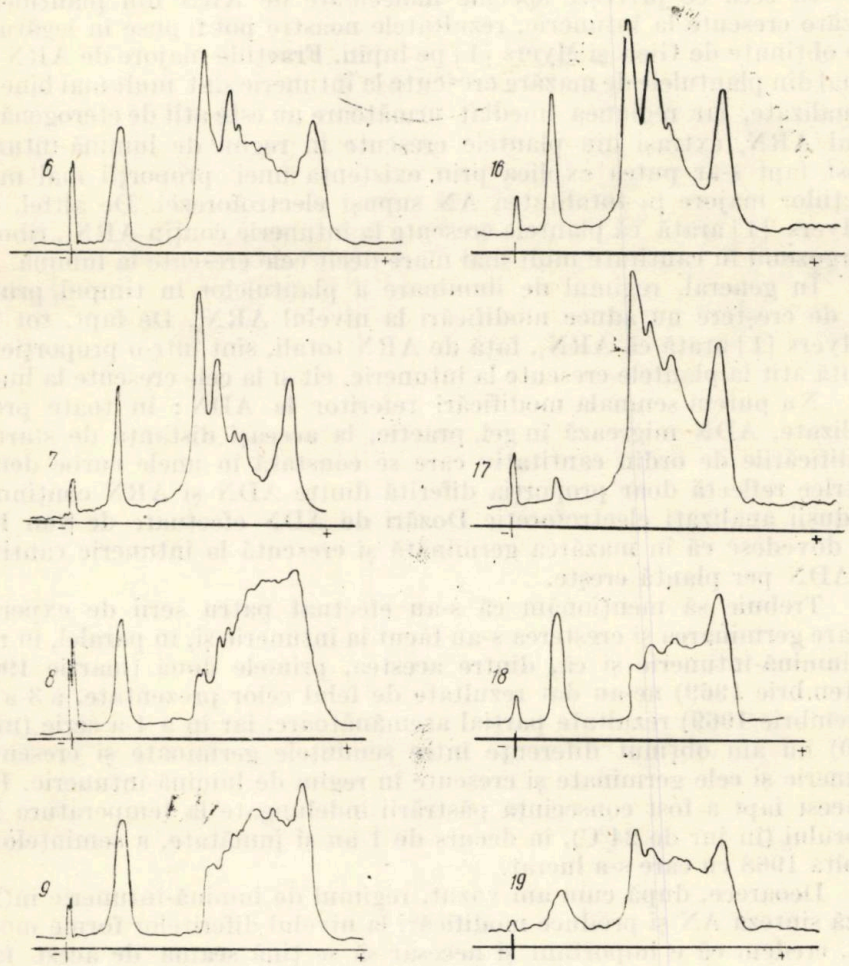


Fig. 2. — Curbele densitometrice ale electroforeogramelor acizilor nucleici extraşi din diferitele organe de mazăre germinată şi crescută la întuneric (nr. 1—9) şi în regim de lumină-întuneric (nr. 10 — 19).
Vezi legenda de la figura 1.

de lumină-întuneric. De altfel, Barker și Douglas [9], fără a menționa însă condițiile de iluminare, găsesc o activitate nucleazică mare și în creștere în primele 10 zile de la germinarea semințelor de mazăre. Urmărirea activității ribonucleazice în cursul creșterii la întuneric și în regim de lumină-întuneric ne preocupă în prezent și vom reveni în acest sens într-o lucrare ulterioară.

În ceea ce privește speciile moleculare de ARN din plantulele de mazăre crescute la întuneric, rezultatele noastre pot fi puse în legătură cu cele obținute de Giels și Myers [1] pe lupin. Fracțiile majore de ARN ribozomal din plantulele de mazăre crescute la întuneric sînt mult mai bine individualizate, iar regiunea imediat următoare nu este atît de eterogenă ca în cazul ARN_r extrași din plantele crescute în regim de lumină-întuneric. Acest fapt s-ar putea explica prin existența unei proporții mai mari a fracțiilor majore în totalitatea AN supuși electroforezei. De altfel, Giels și Myers [1] arată că plantele crescute la întuneric conțin ARN_r, ribozomi și ergozomi în cantitate mult mai mare decît cele crescute la lumină.

În general, regimul de iluminare a plantulelor în timpul primelor zile de creștere nu aduce modificări la nivelul ARN_s. De fapt, tot Giels și Myers [1] arată că ARN_s, față de ARN totali, sînt într-o proporție constantă atît la plantele crescute la întuneric, cît și la cele crescute la lumină.

Nu putem semnala modificări referitor la ADN; în toate probele analizate, ADN migrează în gel, practic, la aceeași distanță de start, iar modificările de ordin cantitativ care se constată în unele curbe densitometrice reflectă doar proporția diferită dintre ADN și ARN conținuți în produșii analizați electroforetic. Dozări de ADN efectuate de van Parys [8] dovedesc că în mazărea germinată și crescută la întuneric cantitatea de ADN per plantă crește.

Trebuie să menționăm că s-au efectuat patru serii de experiențe în care germinarea și creșterea s-au făcut la întuneric și, în paralel, în regim de lumină-întuneric și că, dintre acestea, primele două (martie 1969 și septembrie 1969) ne-au dat rezultate de felul celor prezentate, a 3-a serie (noiembrie 1969) rezultate parțial asemănătoare, iar în a 4-a serie (martie 1970) nu am obținut diferențe între semințele germinate și crescute la întuneric și cele germinate și crescute în regim de lumină-întuneric. Poate că acest fapt a fost consecința păstrării îndelungate la temperatura laboratorului (în jur de 24°C), în decurs de 1 an și jumătate, a semințelor din recolta 1968 cu care s-a lucrat.

Deoarece, după cum am văzut, regimul de lumină-întuneric influențează sinteza AN și produce modificări la nivelul diferitelor forme moleculare, credem că e important și necesar să se țină seama de acest factor și să se menționeze în lucrările de specialitate amănunte referitoare la condițiile de iluminare folosite în timpul germinării semințelor și al creșterii plantelor.

CONCLUZII

1. Iluminarea semințelor de mazăre în cursul germinării și al creșterii ulterioare a plantulelor produce modificări la nivelul ARN_r și nu influențează ARN_s.

2. ARN$_r$ din mazărea germinată și crescută în regim de lumină-întuneric sînt mai eterogeni decît cei din mazărea germinată și crescută la întuneric.

3. Deosebirile de la nivelul ARN$_r$ din diferitele organe apar în primele zile de după germinare și se estompează ulterior.

4. În primele zile de creștere, ARN$_r$ cu greutate moleculară mare din frunze migrează în gelul de agaroză mai puțin decît cei din tulpini, rădăcini și cotiledoane.

Mulțumim tov. ing. Florin Popa pentru semințele puse la dispoziție și tov. Cornelia Cristea pentru ajutorul tehnic acordat.

Prezentat la redacție la 18 iulie 1970

Institutul de biochimie, București

BIBLIOGRAFIE

1. K. W. Gielcs, A. Myers, Biochim. Biophys. Acta, **87**, 460 (1964).
2. O. P. Bulko, A. S. Vecker, Chem. Abstr., **63**, 6023 c (1965).
3. Y. Sokawa, E. Hase, Plant. Cell. Physiol., **9**, 461 (1968).
4. G. R. Williams, G. D. Novelli, Biochim. Biophys. Research. Com., **17**, 23 (1964).
5. G. R. Williams, G. D. Novelli, Biochim. Biophys. Acta, **155**, 183 (1968).
6. J. L. Nego, A. T. Jagendorf, Biochim. Biophys. Acta, **53**, 237 (1961).
7. P. Rollin, Chem. Abstract., **65**, 10972 a (1966).
8. R. van Parys, Arch. Intern. Physiol. Biochim., **75**, 125 (1967).
9. G. R. Barker, Th. Douglas, Nature, **188**, 943 (1960).
10. L. Botoșăneanu, S. Vasu, Rev. roum. Biochim., **6**, 263 (1969).
11. S. Vasu, Rev. roum. biochim., *6*, 75 (1969).
12. W. Mcindoe, H. Munro, Biochim. Biophys. Acta, **134**, 458 (1967).
13. M. Ombach, T. Galaszewski, J. W. Szarkowski, Bull. Acad. Polon., Sci. (Ser. Sci. Biol.) XIV, 533 (1966).
14. M. Ombach, T. Galaszewski, J. W. Szarkowski, Bull. Acad. Polon., Sci. (Ser. Sci. Biol.), **XI**, 123 (1963).
15. U. E. Loening, J. Ingle, Nature, **215**, 363 (1967).
16. T. Galaszewski, J. W. Szarkowski, M. Ombach, Acta, Soc. Bot. Pol., **36**, 199 (1967).

NUCLEIC ACIDS IN PEA (*PISUM SATIVUM*) SEEDLINGS GROWN IN THE DARK AND IN THE LIGHT-DARK REGIMES

SUMMARY

Nucleic acids in various organs of 2, 5 and 9 days old pea seedlings grown in the dark or in the dark-light regimes were isolated by the phenol method and fractionated by agarose gel electrophoresis. It was found that :

— r-RNAs in pea seedlings grown in the linght-dark regime are more heterogeneous than those în seedlinga grown in the dark, the major fractions of the latter being in exchange much clearer.

— High molecular r-RNAs in the leaves run in the agarose gel less than those in the stems, roots and cotiledons.

— The lighting regime of seedlings seem to induce no alterations at the level of s-RNA.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 1, 13–16 (1971)

RĂSPUNSUL ÎN ANTICORPI AL IEPURILOR IMUNIZAȚI CU ALBUMINĂ SERICĂ UMANĂ DUPĂ O DIETĂ COLESTEROLICĂ

LUCIA BUZILĂ

Rezumat. — Prin hrănirea animalelor cu o dietă colesterolică se obține stimularea capacității lor de a sintetiza anticorpi față de antigene cu imunogenicitate slabă sau care se află în cantitate foarte mică.

Chișiu [1] a arătat că la iepurii hrăniți cu regim colesterolic și grăsimi se poate induce o steatoză hepatică cu icter colestatic [2]. Tot acest autor a observat că la iepurii supuși unei imunizări active se obține un răspuns imun diferențiat dacă animalele au fost în prealabil hrănite, o perioadă mai lungă sau mai scurtă, cu o dietă suplimentată cu colesterol [3], [4]. Astfel, iepurii imunizați cu bilă omologă sînt capabili să formeze anticorpi precipitanți față de antigenele specifice biliare, cu condiția ca animalele să fi fost supuse mai înainte unui regim colesterolic [3], [4].

Experiențele citate par să indice că regimul alimentar sus-amintit este capabil să influențeze sistemul celular anticorpoformator în sensul mobilizării unor clone „împiedicate" (*forbidden*). Deoarece acest regim alimentar are perspectiva de a reprezenta o cale generală de stimulare a răspunsului în anticorpi pentru antigene slabe, ne-am propus să verificăm acest răspuns, utilizînd ca antigen un preparat de albumină serică umană și să măsurăm atît concentrația anticorpilor serici formați, cît și numărul tipurilor de anticorpi în raport cu antigenele de natură globulinică prezente sub formă de urme în preparatul de albumină. Măsurarea concentrației anticorpilor s-a făcut prin tehnica imunoadsorbției cantitative, iar numărul anticorpilor s-a determinat prin înregistrarea liniilor de precipitare, care, în analiza imunoelectroforetică, apar alături de linia albuminei.

MATERIAL ȘI METODE

Puritatea preparatului de albumină serică umană (Imuna, Cehoslovacia, puritate 96,7%). La electroforeza pe gel de agaroză nu se distinge decît o singură bandă electroforetică. La analiza imunoelectroforetică a preparatului cu un ser de iepure antialbumină (Sevac, Praga) se obține numai o linie de precipitare, foarte puternică, pentru albumină.

Imunizarea animalelor. S-au constituit două loturi de cîte 5 iepuri fiecare. Unul dintre loturi a fost hrănit timp de 10 zile cu regimul cole-

sterolic (100 g/zi dintr-o hrană preparată după indicațiile lui Chișiu [5]). După o pauză de 4 zile, în care animalele au fost hrănite ca și lotul-martor, s-au început imunizările. Atît animalele din lotul hrănit cu regimul colesterolic, cît și cele din lotul-martor au primit subcutan fiecare cîte 40 mg de albumină serică în patru doze de cîte 10 mg. La prima injecție, albumina serică umană s-a emulsionat cu adjuvant Freund complet, iar la celelalte s-au administrat în asociație cu gel de hidroxid de aluminiu (Serva). Intervalul dintre prima și a doua injecție a fost de 3 săptămîni, iar între celelalte s-au lăsat pauze de cîte 2 săptămîni. Sîngerarea la alb s-a efectuat la 8 — 9 zile de la ultima injecție.

Imunoelectroforeza. S-a utilizat un gel de agaroză 1% în tampon veronal-veronal sodic, pH = 8,6; puterea ionică în gel a fost de 0,016, iar în cuvele electrozilor de 0,05. Timpul de migrare a fost de 2½ ore la un potențial de 5 V/cm și o intensitate de 1 mA/cm.

S-au folosit serurile imune antialbumină obținute atît de la iepurii cu regim colesterolic, cît și de la cei din lotul-martor. S-au folosit și concentratele antiserurilor amintite mai sus, obținute prin precipitarea serurilor cu sulfat de amoniu la o concentrație de 40% și reluarea precipitatelor la un volum de trei ori mai mic decît cel inițial.

Dozarea anticorpilor. S-a utilizat ca imunosorbent PAB-celuloză fin divizată, de care s-a legat, prin procedeele obișnuite [6], albumină serică umană sau un preparat globulinic obținut prin reprecipitări succesive ale unui amestec de seruri umane cu sulfat de amoniu la o concentrație de 50%. Preparatul globulinic nu mai conține decît urme nedozabile de albumină. Determinarea concentrației anticorpilor antialbumină și antiglobuline din serurile imune s-a făcut adăugînd 1 ml de antiser peste 3 ml de soluție PAB-celuloză-proteină (care conține 30 mg de imunosorbent). După o incubare de 1 oră la temperatura camerei (25° C) cu agitare ocazională, preparatele s-au centrifugat și depozitele s-au spălat cu o soluție de NaCl 0,145 M rece pînă la îndepărtarea proteinei în exces. După ultima spălare, peste depozite s-au adăugat cîte 2,2 ml tampon glicocol-HCl-NaCl 0,1 N, pH= 1,8 [7], s-a agitat și s-a lăsat peste noapte la + 4°C. S-au centrifugat probele, iar concentrația proteică a supernatantelor limpezi s-a determinat spectrofotometric la 280 nm. Valorile au fost corectate pentru adsorbția nespecifică, utilizînd în acest scop un ser de iepure normal [7].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatele obținute sînt concentrate în tabela 1.

Diagramele imunoelectroforetice pentru cîteva antiseruri provenite de la animalele din lotul-martor sau de la cele cu regim colesterolic sînt reprezentate în figura 1.

Regimul colesterolic determină o scădere a concentrației anticorpilor antialbumină la jumătate în raport cu cea a animalelor din lotul-martor, în timp ce concentrația anticorpilor antiglobuline nu diferă semnificativ la cele două loturi. Această constatare dovedește că regimul cole-

Tabela 1

Concentrația anticorpilor în antiseruri și numărul liniilor de precipitare date de aceste antiseruri cu ser normal uman

Dietă	Concentrația anticorpilor (μg/ml)		Numărul liniilor de precipitare *	
	antialbumină	antiglobulină	antiseruri concentrate	antiseruri neconcentrate
Suplimentată cu colesterol	387±42	111±14	7–8	6
Nesuplimentată cu colesterol	761±50	116±17	4	3

* Nu s-a numărat linia de precipitare pentru albumină, prezentă în toate probele.

sterolic nu intensifică sinteza de anticorpi față de antigenul principal, albumina, ci o slăbește notabil, efect care nu este compensat de o creștere globală a sintezei anticorpilor antiglobuline.

Deși concentrația anticorpilor antiglobuline nu este crescută în urma administrării dietei, capacitatea animalelor de a sintetiza anticorpi față de impuritățile globulinice din preparat apare crescută, serurile animalelor hrănite fiind capabile să recunoască un număr mai mare de antigene globulinice din serul sangvin (tabela 1 și fig. 1). Acest efect este cu atît mai remarcabil, cu cît el se adaugă peste o imunizare cu adjuvant Freund complet, considerată ca reprezentînd *per se* o cale de stimulare nespecifică a anticorpogenezei [8].

Lărgirea specificității (polivalenței) serurilor recoltate de la animalele supuse regimului suplimentat cu colesterol arată că acest tratament determină o stimulare, dacă nu chiar o intrare în activitate, a clonelor celulare capabile să sintetizeze anticorpi față de impuritățile globulinice prezente în preparatul albuminic. În absența stimulului, clonele se mențin la un nivel de activitate prea scăzut pentru a putea realiza în ser concentrații de anticorpi care să permită reacții de precipitare în gel vizibile la imunoelectroforeză. Acest lucru este sugerat de experiențe care arată că prin triplarea concentrației anticorpilor se poate evidenția un număr mai mare de linii de precipitare atît cu serurile animalelor din lotul-martor, cît și cu ale celor tratate, diferența dintre ele menținîndu-se însă semnificativă.

Rezultatele obținute nu permit nici o concluzie asupra nivelului celular la care acționează regimul colesterolic administrat. Se poate doar presupune ca mai probabil un efect asupra sistemului celulelor macrofage, implicate în prelucrarea antigenelor [9], pe baza constatării că macrofagele tisulare și cele circulante cresc considerabil în urma administrării acestui regim [10], [11]. Dacă această creștere este corelată cu o mai eficientă prelucrare a antigenelor aflate în cantitate foarte mică (ceea ce nu este demonstrat), atunci apare posibil ca creșterea numărului de anticorpi cu specificitate diferită să fie provocată de o acțiune a tratamentului la nivelul macrofagelor.

Faptul că sinteza anticorpilor antialbumină este deprimată la animalele tratate vine în sprijinul ideii că efectul stimulator al regimului s-ar putea exercita direct asupra celulelor imunocompetente; lărgirea număru-

lui de clone recrutate pentru sinteza anticorpilor antiglobuline ar avea drept consecinţă o diminuare a activităţii celulelor care sintetizează anticorpii antialbumină. Această posibilitate a fost demonstrată experimental de Braun [12], care a arătat că administrarea unor substanţe care modifică permeabilitatea membranei limfocitare determină apariţia unor anticorpi cu specificităţi noi, acest fenomen fiind asociat cu scăderea cantităţii de anticorpi sintetizaţi faţă de antigenul folosit la imunizare.

CONCLUZII

Animalele supuse unui regim alimentar suplimentat cu colesterol dobîndesc o capacitate mărită de a sintetiza anticorpi faţă de antigene cu o imunogenicitate slabă sau aflate într-o cantitate foarte mică.

Tratamentul nu măreşte însă concentraţia în ser a anticorpilor care apar şi în sîngele animalelor-martor. Dimpotrivă, concentraţia lor poate să apară mai scăzută în serul animalelor cu dietă colesterolică.

Prezentată la redacţie la 28 martie 1970

Laboratorul de imunochimie
Institutul de biochimie,
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. N. St. Chişiu, St. cerc. med. int., **11**, 315 (1970).
2. I. Moraru, C. Cotuţiu, D. Streja, N. St. Chişiu, Acta histochem., **23**, 197 (1967).
3. N. St. Chişiu, St. cerc. med. int., **9**, 553 (1968).
4. N. St. Chişiu, Rev. roum. med. int., **4**, 433 (1967).
5. N. St. Chişiu, Rev. roum. med. int., **7**, 285 (1970).
6. S. Mihăescu, D. Cilievici, Rev. roum. biochim., **6**, 51 (1969).
7. R. S. Nezlin, *Biohimiia antitel*, Izd. Nauk SSSR, Moskva, 1966.
8. V. Gheţie, V. Micuşan, *Analiza imunochimică*, Edit. Academiei, 1968, p. 168.
9. J. H. Humphrey, Antibiotica et chemotherapia, **15**, 7 (1969).
10. N. St. Chişiu, Rev. roum. med. int., **3**, 35 (1966).
11. N. St. Chişiu, St. cerc. med. int., **6**, 93 (1965).
12. W. Braun, Y. Yajima, L. Jimenez, R. Winchurch, Symposium on Developmental Aspects of Antibody Formation and Structure, Prague, 2—8 iunie 1969.

THE ANTIBODIES RESPONSE OF THE IMMUNIZED RABBITS WITH HUMAN SERUM ALBUMIN AFTER A CHOLESTEROL DIET

SUMMARY

Feeding animals by a cholesterol diet, stimulation of their capacity in the synthesis of antibodies against antigens with a weak antigenicity existing in very small quantity is obtained.

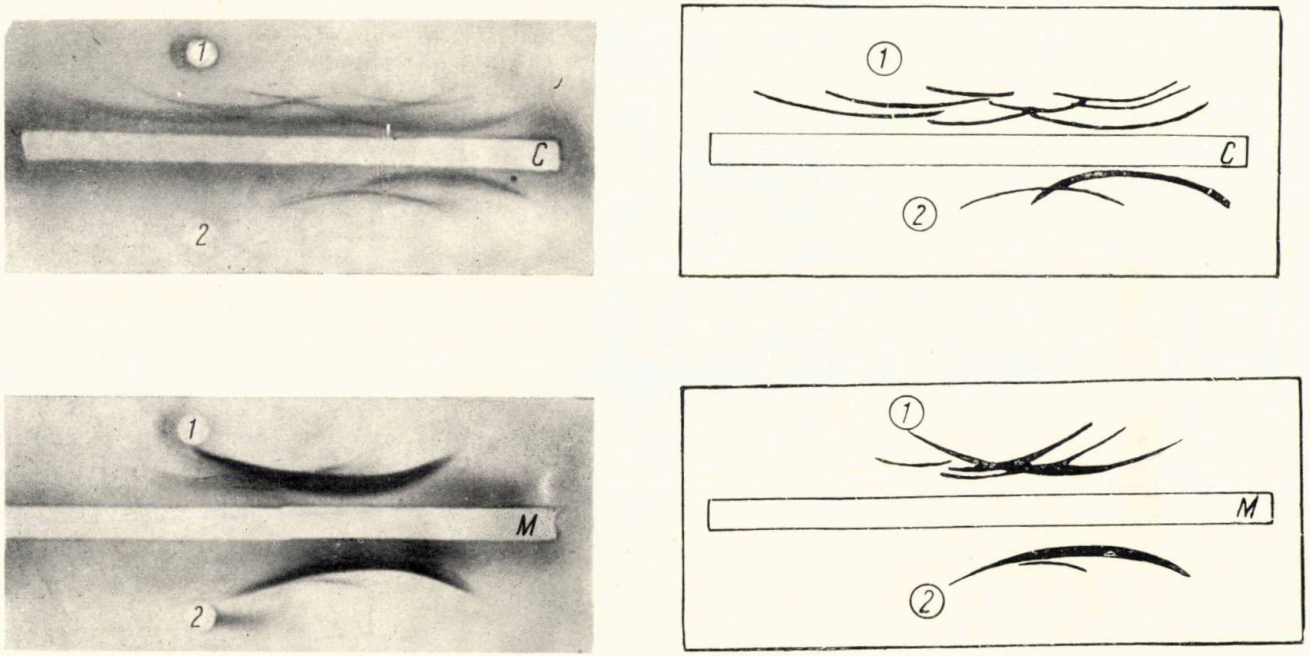


Fig. 1. — Analiza imunoelectroforetică a serului uman normal şi a albuminei serice umane cu antiseruri concentrate antialbumină serică recoltate de la animale hrănite cu regim colesterolic sau necolesterolic. În godeu s-a aplicat ser normal uman şi albumină serică umană, iar în şanţuri serurile imune. *C* — serul animalelor cu regim colesterolic; *M* — serul animalelor cu regim necolesterolic. *1* — ser uman normal; *2* — albumină serică umană.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 1, 17–22 (1971)

IONII DE POTASIU, CALCIU ŞI SODIU ÎN SUCURILE FRUNZELOR STIMULATE ELECTRIC

IRINA CORNOIU

Rezumat — Cercetările efectuate pe sucurile frunzelor de porumb şi de varză stoarse în condiţii diferite arată că atît cantitatea sucului vacuolar şi plasmatic, cît şi aceea a ionilor de potasiu, calciu şi sodiu pe care îi conţin variază sub influenţa stimulării electrice. Interpretarea de pe poziţiile teoriei biostructurii a rezultatelor obţinute duce la concluzia că stimularea electrică provoacă destrămarea parţială a biostructurii şi eliberarea apei şi a ionilor cuprinşi în ea.

Conform teoriei biostructurii, o parte a materiei care alcătuieşte protoplasma vie este integrată într-o structură cu totul specială, numită biostructură, iar o altă parte se prezintă sub forma unei „soluţii intraplasmatice" [1]. Prin stoarcerea frunzelor vii, soluţia lor intraplasmatică, împreună cu lichidul vacuolar, se scurge sub forma unui suc care poate fi numit suc vacuolar. Dacă însă vreun factor provoacă destrămarea mai mult sau mai puţin înaintată a biostructurii, atunci apa şi diferite substanţe hidrosolubile eliberate din biostructură se adaugă la soluţia intraplasmatică [2]. De aceea, prin stoarcerea frunzelor supuse acţiunii unui asemenea factor se obţine o cantitate sporită de suc, cu o altă compoziţie decît aceea a sucului vacuolar, numit suc vacuolar modificat [1].

Prin măsurarea cantităţii acestor sucuri şi prin analiza lor se poate stabili prin diferenţă cantitatea de apă şi substanţe hidrosolubile eliberate din biostructură sub acţiunea factorului respectiv. Reziduul care rămîne în presă după stoarcerea sucului vacuolar din frunzele-martor continuă să rămînă viu; el conţine biostructura. Prin omorîrea acestui reziduu se obţine o nouă cantitate de suc, provenit din destrămarea totală a biostructurii, numit suc plasmatic. Dacă se stoarce însă reziduul, omorît în prealabil, care rămîne în presă după îndepărtarea sucului vacuolar modificat din frunzele supuse factorului menţionat, se obţine o cantitate de suc pro-

[1] Pentru distingerea sucurilor ce se obţin prin stoarcerea materialului vegetal în diferite condiţii experimentale, vom folosi denumirile propuse de E. Macovschi, şi anume: *suc vacuolar*, care se obţine prin stoarcerea materialului vegetal viu; *suc plasmatic*, care se obţine prin stoarcerea reziduului rămas în presă după îndepărtarea sucului vacuolar şi omorîre prealabilă; *suc mixt*, care se obţine prin stoarcerea materialului vegetal omorît (sucul mixt reprezentînd amestecul sucurilor vacuolar şi plasmatic); *suc vacuolar modificat*, care se obţine prin stoarcerea materialului vegetal viu în care biostructura a fost parţial destrămată; *suc plasmatic modificat*, care se obţine prin stoarcerea reziduului rămas în presă după îndepărtarea sucului vacuolar modificat şi omorîre prealabilă.

venită din destrămarea restului de biostructură care mai persistă în el, numit suc plasmatic modificat.

Cercetînd comportarea frunzelor vii față de acțiunea excitantă a razelor ultraviolete, s-a constatat că frunzele iradiate dau cam aceeași cantitate de suc ca și cele neiradiate, însă concentrația acestuia este crescută. S-a dedus că razele ultraviolete provoacă o destrămare parțială a biostructurii, eliberînd o parte din substanțele hidrosolubile care pînă atunci se găseau integrate în ea [3].

Acest rezultat ridică problema comportării biostructurii diferitelor frunze vii față de acțiunea excitantă a altor agenți, ca, de exemplu, a curentului electric. Anume era interesant de stabilit dacă, în condițiile stimulării electrice a frunzelor vii, biostructura lor eliberează ioni de potasiu, calciu și sodiu.

Cercetările noastre anterioare au arătat că cea mai mare parte a potasiului și a calciului celular este integrată în straturile superficiale ale biostructurii [4]. În cazul stimulării, parte din acești ioni ar urma să treacă din biostructura foliară în lichidul intracelular, însoțiți fiind eventual de o anumită cantitate de apă provenită din biostructură.

Pentru a verifica această supoziție am efectuat unele cercetări pe frunze de diferite plante, stimulîndu-le electric.

MATERIAL ȘI METODĂ

Cercetările le-am efectuat pe frunze de porumb în vîrstă de 3 săptămîni și pe frunze din căpățîni de varză.

În cazul frunzelor de porumb, atît probele destinate stimulării, cît și probele-martor erau alcătuite din aceeași cantitate de frunze.

La varză, frunzele se tăiau longitudinal în două de-a lungul nervurii principale, care se arunca; una din jumătăți intra în alcătuirea probelor destinate stimulării, iar cealaltă în alcătuirea probelor-martor.

Stimularea se făcea cu curent electric alternativ de la rețea (120 V și 50 Hz), trecut prin trei becuri electrice de cîte 60 W legate în serie, și dura timp de 1 oră.

În cazul stimulării frunzelor-probe de cîte 25 g de frunze de porumb și, respectiv, 30 g de frunze din căpățîni de varză, le introduceam în presa hidraulică de laborator tip Hafico, model $2L$, prevăzută cu dispozitivul special pentru cantități mici de material vegetal. Deasupra frunzelor se plasa un electrod discoidal de oțel inoxidabil cu margini izolate, pentru a evita scurtcircuitarea prin corpul presei. Legătura dintre electrod și sursa de curent se asigura printr-o sîrmă izolată, introdusă în corpul presei prin orificiile de scurgere. Corpul presei servea ca electrodul al doilea. Imediat după stimulare, frunzele se storceau la 150 atm, presiune care se menținea pînă cînd materialul înceta să mai cedeze suc. Ca martor serveau frunze stoarse în aceleași condiții, fără a fi însă stimulate.

Pentru omorîrea reziduului și destrămarea biostructurii rămase în el, acesta se introducea pentru 24 de ore într-un exsicator, pe fundul căruia se afla soluție concentrată de aldehidă formică, avînd grijă ca aceasta

să nu atingă materialul vegetal. Materialul omorît era apoi stors ca mai sus, iar sucul rezultat obţinut se măsura şi se prelucra ca şi cel obţinut din frunze înainte de omorîrea reziduului.

Sucurile obţinute se măsurau şi se centrifugau timp de 30 min la 6 000 de ture, se diluau cu apă bidistilată în proporţie 1/20, iar ionii de potasiu, calciu şi sodiu se determinau la fotometrul cu flacără.

Fiecare experienţă a fost repetată de 10 ori, iar datele analitice obţinute, prelucrate statistic, sînt prezentate în tabelele 1 şi 2.

Tabela 1

Cantitatea de suc (ml), concentraţia lui în ioni de potasiu, calciu şi sodiu (mg/100 ml) şi cantităţile de ioni cuprinse în suc (mg) la probele-martor şi la cele stimulate electric (valori medii din 10 experienţe)

Planta	Componentul determinat	Sucul vacuolar (frunze-martor)	Sucul vacuolar modificat (frunze stimulate)
Porumb	Suc (ml)	7,4± 1,0	10,0± 1,0
	K^+(mg/100 ml suc)	279,0±60,0	270,0±57,0
	Ca^{++} ,, ,, ,,	28,0± 8,0	25,0± 6,0
	Na^+ ,, ,, ,,	76,0±21,0	78,0±19,0
	K^+(mg în suc)	20,6± 4,0	27,0± 4,0
	Ca^{++} ,, ,,	2,1± 0,6	2,5± 0,6
	Na^+ ,, ,,	5,6± 1,8	7,8± 1,6
Varză	Suc (ml)	7,7± 0,77	10,4± 1,0
	K^+ (mg/100 ml suc)	110,0± 9,6	131,0±31,7
	Ca^{++} ,, ,, ,,	5,77± 1,77	5,65± 1,48
	Na^+ ,, ,, ,,	6,4± 0,9	9,5± 3,0
	K^+ (mg în suc)	8,47± 1,3	13,6 ± 2,8
	Ca^{++} ,, ,,	0,44± 0,13	0,58± 0,13
	Na^+ ,, ,,	0,49± 0,05	0,98± 0,21

Rezultatele obţinute şi semnificaţia lor. După cum se constată din tabelele 1 şi 2, cantitatea de suc vacuolar modificat atît din frunzele de porumb, cît şi din cele de varză stimulate este mai mare decît cantitatea de suc vacuolar obţinut din frunzele-martor ale aceloraşi plante. Aceasta înseamnă că curentul electric provoacă eliberarea unei părţi din apa cuprinsă în biostructură. În schimb, concentraţia ionilor de potasiu, calciu şi sodiu în sucurile vacuolare obţinute din frunzele-martor şi în sucurile vacuolare modificate obţinute din frunzele stimulate nu prezintă deosebiri semnificative. Cum însă frunzele stimulate dau o cantitate mai mare de suc decît cele nestimulate, cantitatea ionilor menţionaţi cuprinsă în volumele integrale ale sucurilor vacuolare modificate depăşeşte pe aceea aflată în sucurile vacuolare martor. Aceasta se constată mai ales la ionii de potasiu şi sodiu, mai puţin la cei de calciu. Înseamnă că stimularea electrică provoacă eliberarea din biostructură nu numai a apei, ci şi a ionilor menţionaţi.

Rezultatele analizei sucurilor plasmatice şi plasmatice modificate obţinute din reziduurile omorîte cu formaldehidă ale frunzelor-martor şi ale celor stimulate electric sînt consemnate în tabela 2. Se constată că la porumb cantitatea de suc plasmatic modificat obţinută din reziduurile frunzelor stimulate este mai mică decît cantitatea de suc plasmatic obţinută din reziduurile frunzelor-martor, pe cînd la frunzele de varză se constată o creştere semnificativă.

Tabela 2

Cantitatea de suc (ml), cocentrația lui în ioni de potasiu, calciu și sodiu (mg/100 ml). și cantitățile de ioni cuprinse în suc (mg) la probele-martor și la cele stimulate electric (valori medii din 10 experiențe)

Planta	Componentul determinat	Suc vacuolar (frunze-martor)	Suc plasmatic (frunze-martor)	Suc vacuolar modificat (frunze stimulate)	Suc plasmatic modificat (frunze stimulate)
Porumb	Suc (ml)	8,6 ± 1,03	6,1 ± 0,6	9,7 ± 1,0	5,6 ± 0,5
	K^+ (mg/100 ml suc)	237,5 ±30,0	255,1 ±16,0	287,0 ±32,5	686,1 ±35,5
	Ca^{++} ,, ,, ,,	31,9 ± 3,2	37,7 ± 6,3	23,1 ± 4,6	33,9 ± 1,9
	Na^+ ,, ,, ,,	58,9 ± 3,6	102,8 ± 4,5	68,8 ± 0,5	123,4 ± 0,5
	K^+ (mg suc)	20,0 ± 1,6	15,5 ± 0,72	27,8 ± 2,3	38,4 ± 2,6
	Ca^{++} ,,	2,74± 0,4	2,29± 0,4	2,24± 0,32	1,89± 0,15
	Na^+ ,,	5,0 ± 0,35	6,27± 0,6	6,67± 0,8	6,91± 0,1
Varză	Suc (ml)	7,0 ± 0,57	3,5 ± 0,63	9,3 ± 1,5	5,3 ± 0,4
	K^+ (mg/100 ml suc)	112,0 ± 8,1	167,3 ±45,0	161,6 ±15,3	568,0 ± 8,7
	Ca^{++} ,, ,, ,,	7,5 ± 0,57	10,7 ± 2,0	8,0 ± 0,57	23,1 ± 3,0
	Na^+ ,, ,, ,,	8,0 ± 0,57	52,5 ± 3,7	14,5 ± 0,57	87,3 ± 6,7
	K^+ (mg suc)	7,84± 0,67	5,85± 0,67	15,0 ± 1,0	30,1 ± 1,7
	Ca^{++} ,,	0,52± 0,5	0,37± 0,2	0,74± 0,12	1,22± 0,12
	Na^+ ,,	0,56± 0,1	1,83± 0,3	1,35± 0.22	4,6 ± 0,1

Concentraţia ionilor de potasiu şi sodiu în sucurile plasmatice modificate de porumb şi varză obţinute din material stimulat este mai mare decît în sucurile plasmatice obţinute din material martor. Numai în cazul concentraţiei ionilor de calciu se constată o creştere la varză şi o scădere la porumb. În privinţa cantităţilor de ioni cuprinse în biostructura sucurilor plasmatice şi plasmatice modificate, deosebirile sînt şi mai elocvente. Astfel, sucurile plasmatice modificate din reziduurile frunzelor de varză stimulate conţin cam de şase ori mai mulţi ioni de potasiu, cam de trei ori mai mulţi ioni de calciu şi cam de două ori mai mulţi ioni de sodiu decît sucurile plasmatice obţinute din materialul nestimulat. La porumb, asemenea deosebiri mari se constată numai în cazul ionilor de potasiu, a căror cantitate se dublează în urma stimulării.

Pentru a interpreta aceste din urmă rezultate, vom ţine seama de faptul că inhibitori metabolici provoacă o eliberare de apă şi alte substanţe din biostructura frunzelor de porumb [5]. S-a constatat că reziduul frunzelor tratate cu inhibitori metabolici dă după omorîre cu zăpadă carbonică mai puţin suc şi mai puţine substanţe hidrosolubile decît reziduul rămas de la frunzele-martor, deoarece o parte din apă şi alte substanţe biostructurate au fost eliminate anterior, o dată cu sucul vacuolar modificat. De asemenea vom lua în considerare faptul, consemnat într-o lucrare anterioară [2], că anumite însuşiri ale produşilor pe care proteinele protoplasmatice îi formează cu formaldehida depind de starea şi de originea acestor proteine în momentul combinării, şi anume aceşti produşi pot reţine cantităţi diferite de apă, ioni şi alte substanţe chiar dacă materialul respectiv este tratat în condiţii identice. Astfel se explică de ce reziduurile frunzelor de porumb stimulate electric dau după tratare cu formaldehidă o cantitate mai mică de suc plasmatic modificat faţă de cantitatea de suc plasmatic dată de reziduurile frunzelor nestimulate, pe cînd la reziduurile frunzelor de varză situaţia este inversă. Se explică şi proporţiile diferite de ioni pe care le conţin sucurile respective.

CONCLUZII

Stimularea electrică a frunzelor vii de porumb şi de varză provoacă destrămarea parţială a biostructurii, cu eliberarea unor cantităţi de apă şi ioni de potasiu şi sodiu, variaţiile la ionii de calciu fiind mai puţin semnificative.

Prezentat la redacţie la 3 august 1970

Institutul de biochimie, Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. Macovschi E., St. cerc. biochim., **8**, 371 (1965).
2. Macovschi E., Marineanu I., Rev. roum. Biochim., **4**, 235 (1967).
3. Macovschi E., Ceauşescu S., St. cerc. biochim., **11**, 331 (1968).
4. Macovschi E., Marineanu I., Rev. roum. Biochim., **5**, 257 (1968).
5. Macovschi E., Frunzeti V., St. cerc. biochim., **12**, 19 (1969).

POTASSIUM, CALCIUM AND SODIUM IN THE SAPS OF ELECTRICALLY STIMULATED LEAVES

SUMMARY

Investigations carried out on saps of corn and cabbage leaves, expressed under various conditions, show that the amounts of vacuolar and plasmatic sap as well as of potassium, calcium and sodium vary under the influence of electric stimulation. Interpretation of results in the light of the biostructure theory leads to the conclusion that electric stimulation induces the breakdown of biostructure and the release of water and ions included in it.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 1, 23–31 (1971)

APLICAREA CROMATOGRAFIEI DE FILTRARE MOLECULARĂ PE SEPHADEX LA DETERMINAREA GREUTĂȚII MOLECULARE A UNOR GLICOPROTEINE DIN ȚESUTURI TUMORALE, OBȚINUTE ÎN URMA ACȚIUNII STIMULATOARE A MEDIATORILOR CHIMICI

A. DUMITRIU și I. KIȚULESCU

Rezumat. — În lucrarea de față au fost utilizate cîteva feluri de Sephadex pentru determinarea greutății moleculare a unor glicoproteine extrase din ficatul șobolanilor purtători de tumori și rezultate în urma activărilor proteazice induse selectiv de mediatori chimici ai activității nervoase.

Rezultatele obținute arată că glicoproteinele studiate au greutăți moleculare mici, în majoritate sub aceea a citocromului c (12 400), fiecare dintre ele fiind legată de proteine cu greutate moleculară mai mare (între 10 000 și 25 000), care se găsesc în cantitate mică în raport cu cantitatea glicoproteinei, rapoartele cantitative fiind specifice pentru fiecare dintre glicoproteinele studiate.

Se diferențiază acțiunea mediatorilor chimici la nivelul țesutului netumoral al șobolanilor purtători de tumori prin glicoproteinele rezultate, ale căror activități diferențiate sînt strîns legate de deosebirile lor structurale.

În cercetările noastre privind rolul mediatorilor chimici ai activității nervoase în mecanismele de control ale metabolismului celular și modul lor de acțiune, am constatat că histamina (H), acetilcolina (Actc.) și tiaminpirofosfatul (TPP) au capacitatea de a stimula formarea unor glicoproteine cu rol de derepresori de ADN [1], [2].

Am observat, de asemenea, că glicoproteinele extrase din ficatul șobolanilor canceroși, în urma administrării acestor substanțe, diferă de cele produse prin aceiași factori la șobolanii normali [3]. Pentru a urmări mecanismul prin care mediatorii chimici realizează diferențiat această acțiune, am produs experimental astfel de glicoproteine, cărora le-am cercetat caracteristicile fizico-chimice și funcționale.

În lucrarea de față am determinat greutățile moleculare ale unor glicoproteine extrase din ficatul șobolanilor purtători de tumori și rezultate din activitățile proteazice induse selectiv de mediatorii chimici ai activității nervoase, utilizînd metoda cromatografiei în strat subțire de Sephadex.

MATERIAL ȘI METODĂ

Compararea comportării unor proteine cu greutate moleculară necunoscută cu a altora cu greutate moleculară cunoscută stă la baza cîtorva metode care pot fi utilizate pentru aprecierea greutății lor moleculare. Între acestea, filtrarea moleculară prin geluri s-a afirmat în ultimii ani drept o metodă comparativă utilizabilă cu succes în acest scop, la început

lucrîndu-se pe coloană de gel de agar, apoi pe coloană și strat subțire (TLC) de Sephadex de diferite porozități [4], [5].

Pentru efectuarea cercetărilor noastre am folosit tehnica filtrării moleculare prin strat subțire, avînd drept mediu suport pentru gel filtrare următoarele tipuri de Sephadex :

— Sephadex G-200, lot nr. 346 ; mărimea particulelor : 40 — 120μ ;
— Sephadex G-100, lot nr. 9262 ; mărimea particulelor : 40 — 120μ ;
— Sephadex G-75, lot nr. 7209 ; mărimea particulelor : 40 — 120μ ;
— Sephadex G-50, lot nr. 6115 ; mărimea particulelor : 20 — 80μ ;

Corelația dintre greutatea moleculară și viteza de migrare pe stratul subțire de diferite feluri de Sephadex, în vederea trasării curbelor etalon, s-a făcut utilizîndu-se următoarele proteine pure, cu greutăți moleculare cunoscute :

— Gamaglobulină umană (NBC),	greut. molec.		160 000
— Serum albumină bovină (NBC),	,,	,,	67 000
— Hemoglobină (pulvis Serva),	,,	,,	64 000
— Pepsină (NBC),	,,	,,	35 000
— Chemotripsină (NBC),	,,	,,	25 000
— Tripsină (NBC),	,,	,,	21 500
— Citocrom c (NBC),	,,	,,	12 400
— ACTH (Hormon adrenocorticotrop) (Biofarm),	,,	,,	~ 5 500

Drept agent de migrare s-a utilizat soluția de NaCl 0,5 M. Evidența produșilor cromatografiați s-a efectuat prin reacțiile de culoare cu ninhidrină, albastru de bromfenol [7] și clor - *o* - toluidină [8].

Probele studiate au fost cinci extracte de glicoproteine, notate T_1 — T_5, reprezentînd :

T_1 — glicoproteină extrasă din ficat de șobolan purtător de tumoră Jensen (hidroliza acidă cu papaină 4 ore) ;

T_2 — glicoproteină extrasă din ficat de șobolan purtător de tumoră Jensen (hidroliză alcalină cu tripsină, 4 ore) ;

T_3 — idem T_1, după administrare de coenzimă A + acetilcolină ;

T_4 — idem T_2, după administrare de histamină ;

T_5 — idem T_1, după administrare de coenzimă A + acetilcolină + + histamină.

Extracția glicoproteinelor s-a efectuat după o metodă publicată anterior [9].

Straturile subțiri de gel (0,5 — 1 mm) s-au preparat pe plăci de sticlă de 20/20 cm (7,8).

Extractele T_1 — T_5 au fost aplicate pe stratul de Sephadex sub formă de soluții apoase în cantități variabile, cuprinse între 10 și 180 μg, în spoturi de 1 — 3 μl și migrate, în solventul utilizat, timp de 4 — 7 ore, după natura Sephadex-ului folosit, unghiul de înclinare al plăcii și temperatura laboratorului. După obținerea spoturilor colorate, determinarea poziției lor pe cromatograme față de start s-a efectuat în comparație cu migrarea citocromului c [5], socotindu-se :

$$\text{R.Cyt} = \frac{\text{deplasarea proteinei}}{\text{deplasarea citocromului c.}} .$$

Aprecierea greutății moleculare s-a dedus din curba etalon de corelație între R.Cyt. c și logG.M., stabilită pentru proteinele considerate drept

etalon. Migrarea a fost socotită suficientă pentru deplasarea spotului de citocrom c cu 6 — 8 cm față de start [4].

REZULTATE

A. Aspectul probelor $T_1 - T_5$ pe stratul de Sephadex G-200 și G-100

Probele aplicate pe plăci cu strat subțire de Sephadex G-200 în cantitate de 10 — 20 μg/spot relevă, după o migrare de 6 — 7 ore în soluție de NaCl 0,5 N, aspectul din figura 1.

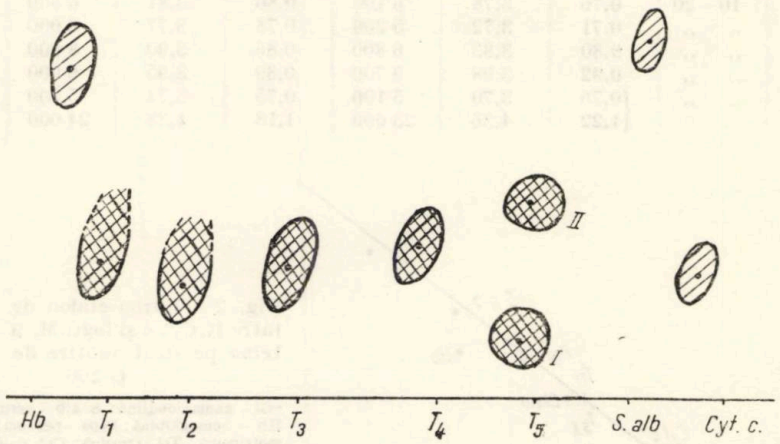


Fig. 1. — Cromatograma pe strat subțire de Sephadex G-200 a extractelor glicoproteice $T_1 - T_5$

Hb — hemoglobină; $T_1 - T_5$ — glicoproteine; I — spot nr. 1 al glicoproteinei T_5; II — spot nr. 2 al glicoproteinei T_5; S. alb — serumalbumină; Cyt. c — Cytocrom c.

Pentru probele T_1 — T_4 se obține cîte un spot situat sub nivelul celui corespunzător citocromului c, deci cu R.Cyt c subunitar, iar pentru T_5 se obțin două spoturi, situate unul deasupra și altul dedesubtul citrocromului c. Greutățile moleculare ale acestor extracte au fost determinate din curba-etalon stabilită pentru Sephadex G-200 și sînt redate în tabela 2.

Tabela 1 cuprinde valorile R.Cyt c ale proteinelor luate drept etalon în sistemele Sephadex G-200 și G-100 în NaCl 0,5 N, după care s-au trasat curbele R.Cyt. c/log G.M. din figurile 2 și 3.

Tabela 1

Valorile R. Cyt.c. ale unor proteine în sistemele Sephadex G-200 — 0,5 m NaCl și Sephadex G-100 — 0,5 m NaCl

Nr.	Proteine	Greut. mol. G.M.	log G.M.	R. Cyt. c		
				Sepadex G-200		Sphadex G.100
				Exp.	lit. *	
1	Gamaglobulină (γ Gl.)	160 000	5,20	1,84	—	1,72
2	Serumalbumină (S. alb.)	67 000	4,83	1,58	1,60—1,78	1,50
3	Hemoglobină (Hb)	64 000	4,81	1,41	1,45—1,48	1,30
4	Pepsină (Peps.)	35 000	4,54	1,35	1,56—1,69	1,23
5	Chemotripsină (Chem.)	25 000	4,40	1,22	1,09—1,25	1,18
6	Tripsină (Try)	21 000	4,33	1,18	1,16—1,25	1,12
7	Cytocrom c (Cyt. c)	12 400	4,09	1,00	1,00	1,00
8	H-adrenocorticotrop (ACTH)	5 500	3,74	0,74	—	0,76

* H. Determann și colab. [5]

Tabela 2

Aprecierea greutăților moleculare a glicoproteinelor $T_1 - T_5$ pe strat subțire de Sephadex G-200 și G-100

Subst.	Cant./ Spot. (μg)	Sephadex G-200			Sephadex G-100			G.M. val. medie
		R. Cyt. c	Log. G.M.	G.M.	R. Cyt. c	Log. G.M.	G.M.	
Cyt.c	10	1,00	4,09	12 400	1,00	4,09	12 400	—
S.alb.	,,	1,58	4,83	67 000	1,50	4,83	67 000	—
T_1	10—20	0,76	3,78	6 100	0,80	3,81	6 500	6 500
T_2	,, ,,	0,71	3,72	5 300	0,78	3,77	6 000	6 000
T_3	,, ,,	0,80	3,83	6 800	0,86	3,90	8 000	7 500
T_4	,, ,,	0,92	3,98	9 700	0,89	3,95	9 000	9 500
T_5	,, ,,	0,70	3,70	5 100	0,75	3,74	5 500	5 500
		1,22	4,36	23 000	1,18	4,38	24 000	23 500

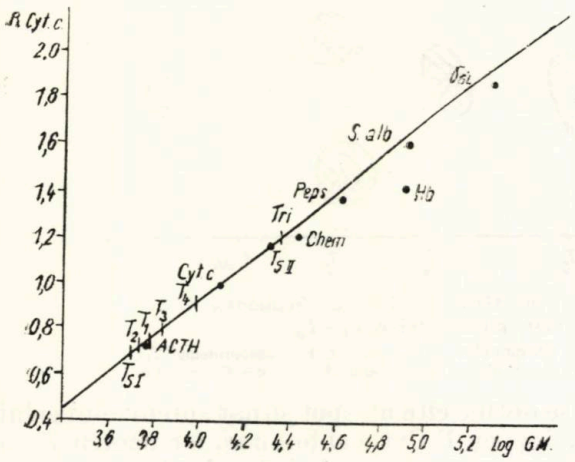


Fig. 2 — Curba-etalon de corelație între R.Cyt.c și logG.M. a unor proteine pe strat subțire de Sephadex G-200.

γGl — gamaglobulină; S. alb — serumalbumină; Hb — hemoglobină; Peps — pepsină; Chem-Chemotripsină; Tri — tripsină; Cyt. c — Cytocrom c; ACTH — horm. adrenocorticotrop; $T_1 - T_5$ I,II — glicoproteine.

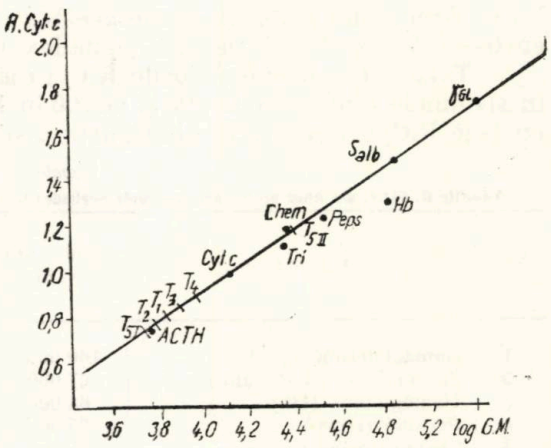


Fig. 3. — Curba-etalon de corelație între R.Cyt.c și log G.M. a unor proteine pe strat subțire de Sephadex G-100 (idem, fig. 2)

Deoarece glicoproteinele cercetate au greutăți moleculare mici (între 5 000 și 25 000), deci ajung la limita inferioară a porțiunii din curba-etalon pentru Sephadex G-200, la care relația dintre distanța de migrare și

logaritmul greutății moleculare este o relație liniară [5], am utilizat și Sephadex G-100, a cărui limită inferioară de aplicabilitate în acest scop este la greutatea moleculară 2 500 [4].

După curba-etalon trasată în funcție de migrarea acelorași proteine socotite pure (fig. 3), s-au obținut pentru greutatea moleculară a celor cinci probe valori apropiate de cele înregistrate pe Sephadex G-200. Valorile medii ale greutăților moleculare deduse din cele două curbe sînt de asemenea înscrise în tabela 2.

Observînd că la concentrații mai mari de 20 μg/spot aspectul spoturilor este diferit (pe aceeași placă), am urmărit migrarea probelor T_1 — T_5, utilizînd diferite cantități de substanță cuprinse între 10 și 180 μg/spot, întîi pe plăci cu strat subțire de Sephadex G-100, apoi de Sephadex G-75 și G-50. Din tabela 3, unde sînt redate rezultatele acestor experiențe pe Sephadex G-100, se constată următoarele. :

Tabela 3

Influența concentrației asupra migrării și conformației spoturilor cromatografice ale probelor T_1 – T_5 pe strat subțire de Sephadex G-100

Proba	conc/ spot (μg)	Spot principal				Dungă frontală				Observații
		R. Cytc.	G.M.	supr. (mm^2)	%	R. Cytc.	G.M.	supr. (mm^2)	%	
T_1	20	0,80	6600	25	70 %	—	—	—	30	Un spot prelung, crescînd în lungime spre linia frontului
	30	0,80		30		1,16		12		
	60	0,81		40		1,11		20		
	120	0,81		58		1,18		28		
	180	0,81	6800	76		1,20	25000	38		
T_2	20	0,78	6000	16	85	—		—	15	un spot mai mic decît T_1, avînd același aspect
	30	0,78		22		—		urme		
	60	0,78		32		1,05		6		
	120	0,79		45		1,12		7		
	180	0,79	6200	46		1,15	21000	8		
T_3	20	0,86	7800	14	92	—		—	8	spot prelung, cu dungă frontală mult mai mică decît T_1
	30	0,87		20		—		—		
	60	0,87		30		1,10		5		
	120	0,88		44		1,11		6		
	180	0,87	7900	55		1,12	18000	6		
	spot principal					spot secundar				
T_4	20	0,79	900	12	95	—	—	—	5	un spot aproape omogen cu G.M. 9— 10 000 și un spot f. mic cu G.M. mare (complet detașat)
	30	0,89		19		—		—		
	60	0,90		27		1,32		urme		
	120	0,92		35		1,32		urme		
	180	0,94	10800	44		1,33	40000	4		
	spot nr. 1					spot nr. 2				
T_5	20	0,70	4700	10	46	1,19	24000	14	54	două spoturi omogene în cantități aproximativ egale
	40	0,70		18		1,20		22		
	60	0,70		30		1,20		35		
	80	0,70	4700	48		1,20	24000	55		

Referitor la aspectul probei T_1, pe măsură ce concentrația soluției de glicoproteină aplicată la start se mărește, deși spotul colorat se intensifică și se lărgește, el își păstrează totuși aceeași valoare pentru R. Cyt.c deci are o așa-zisă izotermă de concentrație liniară.

În afară de acest spot se observă însă o dungă frontală care migrează în avans, dînd aceeași reacție de culoare ca și spotul, însă cu marginea superioară difuză. Valoarea pentru R.Cyt.c corespunzătoare acestei dungi crește cu concentrația probei aplicate pe start, deci ea corespunde unor produși proteici cu greutate moleculară crescîndă pînă la aproximativ 25 000 și cuprinde 30 % din intensitatea întregului spot.

Pentru aceleași concentrații de probă aplicată la start, spotul probei T_2 este mai mic decît la T_1, însă aspectul lui este același, putîndu-se ajunge cu dunga frontală pînă la valori corespunzătoare unor greutăți moleculare de aproximativ 21 000.

Spotul probei T_3 are și el un aspect asemănător cu acela al spotului probei T_1, însă este și mai mic, ajungînd pentru concentrații crescute la valori corespunzătoare unor greutăți moleculare pînă aproape de 18 000, în proporție de 8 % din valoarea întregului spot.

Proba T_4 prezintă un spot aproape omogen pentru toate concentrațiile utilizate, puțin mai mic decît la proba T_2, ajungînd pînă la aproximativ 11 000 greutate moleculară. Se observă însă încă un spot mic (aproximativ 3 — 5 %), complet detașat de spotul principal, cu o migrare mare, depășind migrarea pepsinei, deci corespunzător unei greutăți moleculare de aproximativ 40 000.

În fine, la proba T_5, pentru orice concentrație aplicată la start, se obțin două spoturi omogene, avînd R.Cyt.c independent de concentrație, corespunzînd greutăților moleculare de aproximativ 5 000 și 24 000.

B. Aspectul probelor $T_1 - T_5$ pe celelalte două tipuri de Sephadex

Din determinările făcute de noi și din datele din literatură [4], [8] se constată că pentru greutățile moleculare cuprinse între 5 000 și 25 000 migrările prin Sephadex G-75 și G-50 sînt aproximativ aceleași. Cromatogramele efectuate pe strat subțire de Sephadex G-75 și G-50 confirmă și completează constatările făcute pe celelalte două tipuri de Sephadex, G-200 și G-100.

Figura 4 ilustrează migrarea probelor $T_1 - T_5$ pe strat subțire de Sephadex G-75 și arată că, în timp ce proteinele pure dau spoturi omogene bine conturate, cu o formă aproape simetrică, obținută chiar la concentrații mai mari, probele T_1 — T_4 prezintă spoturi asimetrice, de formă alungită, cu o frunte care avansează către linia frontului pe măsură ce concentrația probei aplicate crește.

Punctul de maximă intensitate al petelor se menține însă constant pentru toate probele studiate. Se diferențiază și pe acest tip de Sephadex, pentru T_1 și T_2, cîte două spoturi (spot principal și dungă frontală), situate în continuare, T_1 avînd o dungă frontală mult mai avansată decît cea corespunzătoare lui T_2.

La proba T_3 se disting trei spoturi în continuare (unul aparţinînd spotului principal, iar două în dunga frontală.

În proba T_4 se disting tot trei feluri de componente, sau, mai corect, o componentă principală, de greutate moleculară mică, şi două feluri de impurităţi proteice (în cantităţi mici): una situată în dunga frontală a

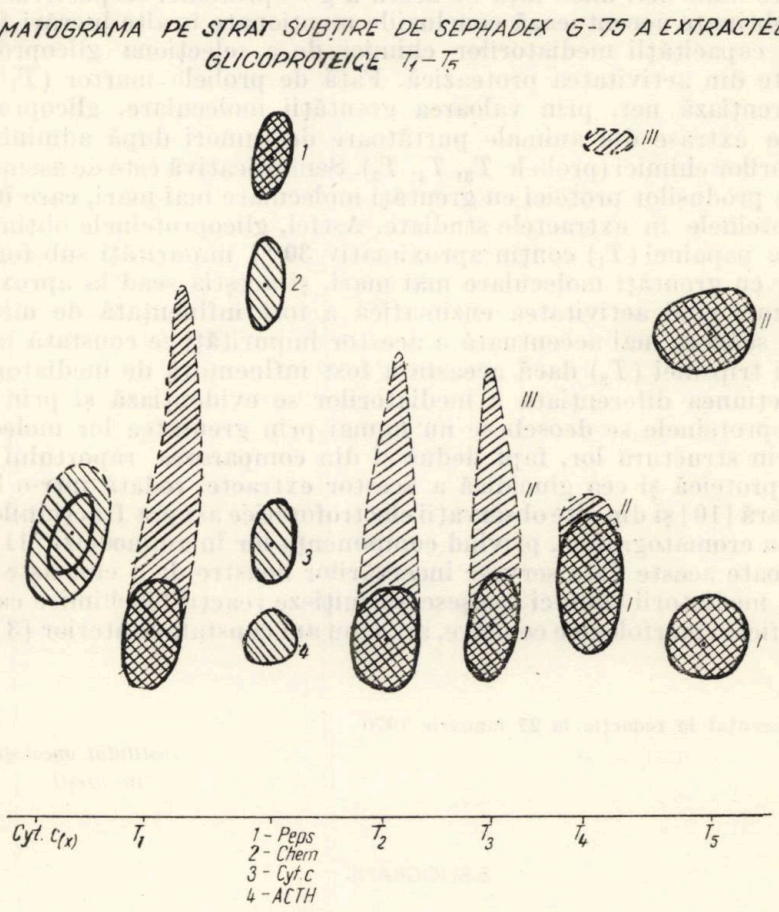


Fig. 4.— Cromatograma pe strat subţire de Sephadex G-75 a extractelor glicoproteice T_1-T_5.

Cyt. $c_{(x)}$ — Cytocrom c (conc. mare); 1 Peps—pepsină; 2 chem—chemotripsină; 3 Cyt. c — Cytocrom c; 4 ACTH — h. adrenocorticotrop; T_1-T_5 — glicoproteine; I, II, III (T_3 şi T_4 — spotul principal şi spoturile secundare de la probele T_3 şi T_4; I, II (T_5) — spotul nr. 1 şi spotul nr. 2 corespunzătoare probei T_5.

componentei principale, alta în domeniul greutăţilor moleculare similare pepsinei.

Pentru proba T_5, aspectul este acelaşi ca pe celelalte tipuri de Sephadex studiate.

DISCUȚII

Cercetările întreprinse ne-au permis să apreciem că glicoproteinele studiate au greutăți moleculare mici, cuprinse între 5 000 și 24 000, fiecare dintre ele fiind legată de proteine cu greutate moleculară mare, însă în cantitate mult mai mică față de aceea a glicoproteinei respective. Rezultatele obținute accentuează concluziile menționate în alte lucrări [3], [9] asupra capacității mediatorilor chimici de a selecționa glicoproteinele rezultate din activitatea protează. Față de probele martor (T_1 și T_2), se diferențiază net, prin valoarea greutății moleculare, glicoproteinele hepatice extrase din animale purtătoare de tumori după administrarea mediatorilor chimici (probele T_3, T_4, T_5). Semnificativă este de asemenea și variația produșilor proteici cu greutăți moleculare mai mari, care însoțesc glicoproteinele în extractele studiate. Astfel, glicoproteinele obținute din acțiunea papainei (T_1) conțin aproximativ 30 % impurități sub formă de produși cu greutăți moleculare mai mari, și aceștia scad la aproximativ 8% atunci cînd activitatea enzimatică a fost influențată de mediatori (T_3). O scădere mai accentuată a acestor impurități se constată în cazul acțiunii tripsinei (T_2) dacă aceasta a fost influențată de mediatori (T_4).

Acțiunea diferențiată a mediatorilor se evidențiază și prin faptul că glicoproteinele se deosebesc nu numai prin greutatea lor moleculară, ci și prin structura lor, fapt dedus și din compararea raportului dintre partea proteică și cea glucidică a acestor extracte, redată într-o lucrare anterioară [10] și din alte observații electroforetice asupra fracțiunilor proteice sau cromatografice, privind componența lor în aminoacizi [11].

Toate aceste date servesc încercărilor noastre de a cunoaște modul în care mediatorii chimici reușesc să inițieze reacții biochimice care duc la modificări morfologice celulare, așa cum am constatat anterior [3].

Prezentat la redacție la 27 ianuarie 1970

Institutul oncologic,
București

BIBLIOGRAFIE

1. I. Kițulescu, D. Pascu, Curiguț A., Rev. roum. Biochim., **2**, 255 (1965).
2. O. Costăchel, I. Kițulescu, D. Pascu, Oncol. Radiol., **5**, 203 (1966).
3. I. Kițulescu, T. Rusănescu, V. Băluță, A. Curiguț, Oncol. Radiol., **6**, 403 (1967).
4. P. Andrews, Biochim. J., **91**, 22 (1964).
5. H. Determann, W. Micheli, Fres. Zeitschf. Anal. Chem., **212**, 211 (1965).
6. J. O. R. Morris, J. Chromat., **16**, 167 (1964).
7. C. Dragomirescu, St. cerc. biochim., **10**, 129 (1967).
8. C. P. Robert, J. Chromat,. **22**, 90 (1966).
9. I. Kițulescu, V. Băluță, D. Pascu, Rev. roum. Biochim., **2**, 145 (1965).
10. I. Kițulescu, T. Rusănescu, D. Pascu, Oncol. Radiol., **5**, 23 (1966).
11. I. Kițulescu, A. Dumitriu, D. Pascu, date nepublicate.

APPLICATION OF MOLECULAR FILTRATION CHROMATOGRAPHY ON SEPHADEX FOR THE DETERMINATION OF MOLECULAR WEIGHT OF SOME TUMORAL GLYCOPROTEINS, OBTAINED FOLLOWING THE STIMULATORY ACTION OF CHEMICAL MEDIATORS

SUMMARY

Several types of Sephadex were employed for the determination of molecular weight of some liver glycoproteins from tumor bearing rats, resulting after proteasic activations selectiv, induced by chemical mediators of nervous activity.

These glycoproteins have low molecular weights, generally below that of cytochrome c (12,400) each one being bound on proteins with higher molecular weights (between 10,000 and 25,000), occurring in a small amount as compared to glycoproteins; the quantitative ratios are peculiar to each glycoprotein studied.

One differentiates the chemical mediators action at the level of nontumoral tissue of tumor bearing rats by the resulting glycoproteins, whose differentiated activities are closely connected with their structural differences.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 1, 33–37 (1971)

GRADUL ETEROGENITĂȚII LANȚURILOR UȘOARE ALE IMUNOGLOBULINELOR EVIDENȚIAT PRIN METODA FOCALIZĂRII IZOELECTRICE

VICTOR GHEȚIE și DOINA ONICĂ

Rezumat — S-au analizat prin metoda focalizării izoelectrice lanțurile *L* provenite din IgG de iepure, dintr-o IgG umană mielomatoasă și o proteină urinară de tip Bence-Jones. Lanțul *L* de iepure a prezentat 7 — 8 benzi electroforetice, iar prin focalizare izoelectrică s-au evidențiat 20 de benzi. În cazul lanțului *L* mielomatos, cele trei benzi electroforetice au fost focalizate în 5 benzi la pH = =3 — 10 și în 9 benzi la pH = 5 — 8. Proteina urinară de tip Bence-Jones, care a prezentat o singură bandă la electroforeză, s-a separat în 5 benzi la pH = 5 — 8.

Lanțurile ușoare ale imunoglobulinelor normale, obținute de la diferite specii, prezintă pe gelurile de amidon sau acrilamidă care conțin uree 8—10 benzi electroforetice [1]. Fiecare bandă electroforetică pare să conțină un anumit număr de lanțuri *L* diferite, cel puțin cinci după calculele lui Choules și Singer [2], așa încît ar exista 40—50 de forme distincte de lanț *L* [3], [4].

Pentru a dovedi că fiecare bandă electroforetică cuprinde mai multe componente cu aceeași sarcină electrică totală, am folosit metoda focalizării izoelectrice [5]. Această metodă permite, în principiu, focalizarea lanțurilor *L* în tot atîtea benzi cîte specii de lanțuri *L* cu puncte izoelectrice diferite există.

Metoda focalizării izoelectrice s-a folosit cu succes pentru fracționarea mai avansată a imunoglobulinelor [6], [7], dar nu s-a găsit o diferență semnificativă a eterogenității proteinelor de tip Bence-Jones și a lanțurilor *L*, analizate atît prin focalizare izoelectrică pe coloană, cît și prin electroforeză în disc [8].

Noi am analizat atît prin metoda focalizării izoelectrice, cît și prin electroforeză pe gel de acrilamidă cu uree, lanțuri *L* izolate din imunoglobulina G de iepure (IgG) și dintr-o IgG umană mielomatoasă și o proteină de tip Bence-Jones.

MATERIAL ȘI METODE

IgG de iepure s-a preparat dintr-un amestec de seruri normale prin precipitare cu $(NH_4)_2SO_4$, la o saturație de 33% și cromatografie pe DEAE-celuloză, în tampon-fosfat 0,02 M, pH = 8,0. S-a folosit frac-

țiunea cromatografică neadsorbită pe schimbător, care conține IgG pură [9].

IgG umană s-a izolat și s-a purificat prin tehnica de mai sus din serul unui bolnav cu mielom IgG, pus la dispoziția noastră de dr. N. Luca de la spitalul Cantacuzino.

Izolarea lanțurilor *L* din cele două preparate de IgG s-a făcut, după reducerea legăturilor disulfidice cu 2-mercaptoetanol 0,5 M și alchilare cu iodacetamidă 0,5 M, prin gel-filtrarea amestecului peste o coloană de Sephadex G-100, eluată cu acid acetic N[10].

Proteina Bence-Jones a fost izolată din urina unui bolnav la care s-a diagnosticat un mielom de tip IgD, pus la dispoziția noastră de dr. N. Șt. Chișiu de la spitalul Cantacuzino. S-a efectuat o precipitare cu $(NH_4)_2SO_4$, la o saturație de 40%, urmată de o gel-filtrare pe o coloană de Sephadex G-75, eluată cu un tampon-fosfat 0,1 M, pH = 7,5, care conține uree 6 M. S-au folosit cele două piscuri care părăsesc primele coloana, separat sau amestecate. Primul pisc conține proteina Bence-Jones sub formă de dimer (G. M. $\sim$ 50 000, determinată prin cromatografie pe strat subțire de Sephadex G-200), iar al doilea pisc, monomerul. Celelalte piscuri cromatografice sînt alcătuite din proteinele urinare care acompaniază proteina Bence-Jones.

Electroforeza s-a făcut în gel de acrilamidă 6%, după metoda orizontală recomandată de Uriel [11], însă din care s-a exclus agaroza. Gelul s-a preparat în tampon-glicocol 0,035 M clorură de sodiu 0,035 M, adus la pH = 7—8 cu NaOH N și care conține uree 6 M. În compartimentele electrozilor s-a introdus tampon borat 0,3 M, pH = 8,2. S-au utilizat plăci cu o lungime de 8 cm, avînd o grosime a gelului de 1,5—3 mm. S-a aplicat un potențial de 2 V/cm, iar durata de migrare a fost de 8 ore pentru lanțul *L* de iepure și de 4 ore pentru lanțul *L* mielomatos și proteina de tip Bence-Jones.

Extracția proteinelor din unele benzi electroforetice s-a făcut cu ajutorul unei tehnici de electroeluție similară cu cea descrisă de Lewis și Clark [12]. Benzile au fost localizate în prealabil prin colorarea rapidă a unei porțiuni înguste, tăiate de-a lungul gelului. Pentru o analiză s-au utilizat proteinele extrase din aceeași bandă electroforetică, decupată din șase plăci. Fracțiunile au fost analizate după o concentrare prealabilă prin dializă față de o soluție de polivinilpirolidonă 50% ce conținea uree 6 M.

Separarea izoelectrică s-a făcut folosind tot un gel de acrilamidă 6% ce conținea amfolit 2% și uree 6 M [13]. În compartimentul anodic s-a introdus acid fosforic 5% (v/v), iar în cel catodic etilendiamină 5% (v/v). S-au utilizat plăci cu o lungime de 8 cm, avînd o grosime a gelului de 1,5 mm. În timpul migrării, intensitatea curentului a scăzut de la 1,5 la 0,1 mA/cm, atingînd o valoare constantă după 9 ore pentru amfolitul cu interval de pH = 3—10, și după 4 ore pentru amfolitul cu un interval de pH mai îngust (3—6 și 5—8). Benzile proteice s-au evidențiat prin imersarea gelurilor în acid tricloracetic 5% și, după o spălare îndelungată cu aceeași soluție, pentru îndepărtarea amfolitului, colorare cu amidoschwarz 1% în acid acetic 7%. Pentru colorarea rapidă a plăcilor s-a folosit tehnica cu albastru de bromfenol 0,2% [14].

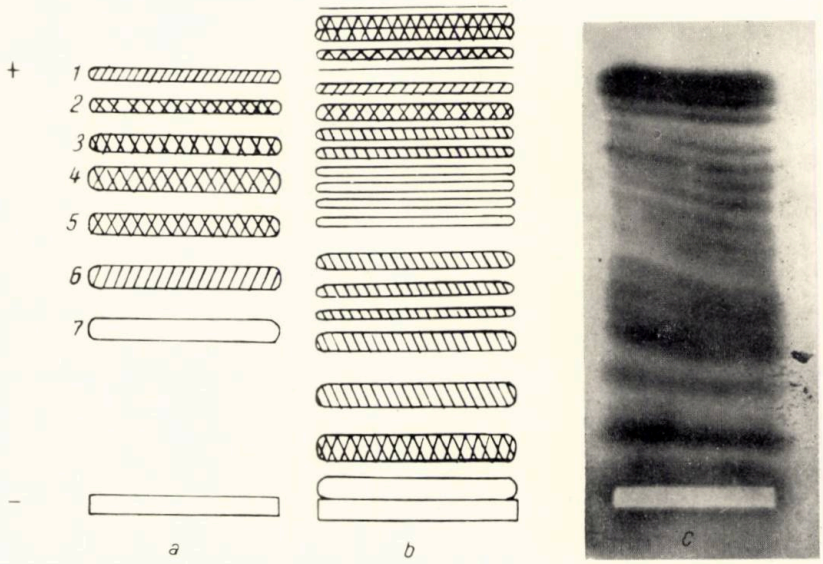


Fig. 1. — Electroforeza şi focalizarea izoelectrică a lanţurilor *L* de iepure în gel de acrilamidă. *a* — electroforeză ; *b* — focalizare, gradient 3—10 ; *c* — focalizare, gradient 3—10 (fotografie).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatul analizei lanțului *L* de iepure prin electroforeză și focalizare izoelectrică este prezentat în figura 1. Cele 7—8 benzi care se obțin în mod normal la electroforeza în gel de acrilamidă cu uree 6 M sînt desfăcute în 20 de benzi prin focalizare izoelectrică în mediu de uree 6 M în cazul utilizării unui amfolit cu un domeniu de pH 3—10. Această constatare sugerează că fiecare bandă electroforetică poate fi subfracționată, în medie, în trei benzi, care conțin variante de lanț *L* ce diferă unele de altele prin punctul lor izoelectric.

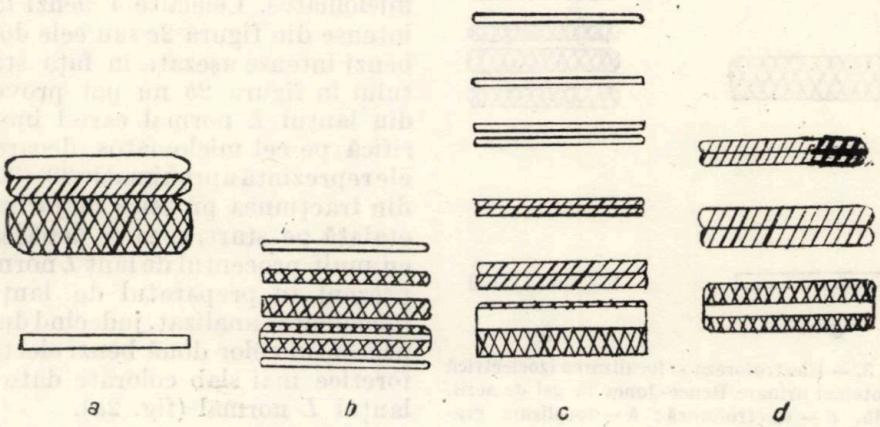


Fig. 2. — Electroforeza și focalizarea izoelectrică a lanțurilor *L* de om (mielom) în gel de acrilamidă. *a* — electroforeza; *b* — focalizare, gradient 3—10; *c* — focalizare, gradient 5—8; *d* — la fel ca *c*, însă s-a analizat o cantitate mai mică.

Eterogenitatea mai avansată constatată pentru lanțul *L* prin focalizare izoelectrică coincide cu observația lui Awdeh și colab. [6] că imunoglobulinele, omogene la electroforeză în gel de acrilamidă, pot fi fracționate în 19 componente prin focalizare izoelectrică. Eterogenitatea izoelectrică a imunoglobulinelor pare a fi dictată de fragmentul lor Fab, care a prezentat o eterogenitate izoelectrică similară cu cea a lanțului *L*, în timp ce fragmentul Fc a apărut omogen [15].

Analizate prin focalizare izoelectrică, proteinele eluate din benzile electroforetice 5 și 6 au prezentat 2—3 benzi apropiate, focalizate în poziții cu atît mai anodice, cu cît proveneau din benzi electroforetice situate mai spre acest pol.

Faptul că într-o bandă electroforetică se găsesc amestecate cîteva componente separabile prin focalizare izoelectrică a fost confirmat cu ajutorul lanțurilor *L* izolate dintr-o IgG mielomatoasă, care prezintă o omogenitate electroforetică binecunoscută (fig. 2 *a*). Acest lanț *L* prezintă o bandă intensă, precedată de două benzi mai slab colorate, așezate spre capătul anodic.

Analizat prin focalizare izoelectrică cu un amfolit avînd un domeniu de pH = 3—10, se constată că lanțul *L* se separă în 3 benzi intense, situate într-o strînsă apropiere în jurul poziției de start și însoțite de benzi mai slabe: una spre capătul anodic și cealaltă spre cel catodic (fig. 2 *b*). Într-un domeniu mai strîns de pH (5—8), lanțul *L* mielomatos se arată a fi și mai eterogen, prezentînd, pe lîngă banda foarte intensă de pe start, încă 4 benzi destul de intens colorate, situate spre capătul anodic al plăcii, și alte 4 benzi atît de slab colorate, încît nu au putut fi fotografiate satisfăcător (fig. 2*c*). Prezența acestora din urmă în diagrama izoelectrică poate fi determinată de impuritățile de lanț *L* normal care însoțesc lanțul *L* mielomatos. Celelalte 4 benzi mai intense din figura 2*c* sau cele două benzi intense așezate în fața startului în figura 2*b* nu pot proveni din lanțul *L* normal care-l impurifică pe cel mielomatos, deoarece ele reprezintă aproximativ 20—30% din fracțiunea proteică majoritară etalată pe start, ceea ce depășește cu mult procentul de lanț *L* normal prezent în preparatul de lanț *L* mielomatos analizat, judecînd după procentul celor două benzi electroforetice mai slab colorate date de lanțul *L* normal (fig. 2*a*).

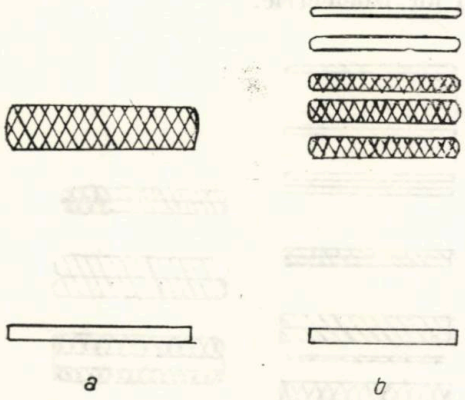


Fig. 3. — Electroforeza și focalizarea izoelectrică a proteinei urinare Bence-Jones în gel de acrilamidă. *a* — electroforeză; *b* — focalizare gradient 5—8.

Cu toate acestea, pentru a îndepărta suspiciunea că eterogenitatea izoelectrică constatată se datorește unei contaminări cu lanț *L* normal, am recurs la analizarea unei proteine Bence-Jones care poate fi izolată din urină practic liberă de lanț *L* normal. Cantitatea foarte scăzută de lanț *L* care se găsește în mod normal în urină [16] face ca prezența sa în proteina Bence-Jones analizată de noi să fie nesemnificativă.

Se observă că proteina Bence-Jones, omogenă la electroforeză, se separă în 5 benzi, dintre care 3 sînt mai intens colorate (fig. 3). Această imagine se menține indiferent dacă s-a analizat primul pisc cromatografic (dimerul) sau al doilea pisc cromatografic (monomerul) sau amestecul lor (vezi metode).

CONCLUZII

Eterogenitatea izoelectrică a lanțurilor *L* normale și patologice este considerabil mai mare decît o indică analiza lor electroforetică în gel de acrilamidă.

Focalizarea izoelectrică este capabilă să distingă variantele de lanț *L* care prezintă diferențe în punctul lor izoelectric și astfel este de

așteptat ca prin această tehnică să se poată surprinde diferențe de eterogenitate între preparate de lanț *L* de diferite proveniențe care n-au putut fi sesizate prin electroforeză.

Prezentat la redacție la 28 martie 1970

Laboratorul de imunochimie
Institutul de biochimie,
București

BIBLIOGRAFIE

1. S. Cohen, R. R. Porter, Biochem. J., **90**, 278 (1964).
2. G. L. Choules, S. J. Singer, Immunochemistry, **3**, 21 (1966).
3. S. Cohen, în *Gamma-globulins, structure and control of biosynthesis* (ed. by J. Killander), Almqvist et Wiksell, Stockholm and Intersci. Publ. New York—Londra—Sydney, 1967, p. 21.
4. F. Haurowitz, în *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, vol. 32, Antibodies, Cold Spring Harbor, New York, 1967.
5. O. Vesterberg, H. Swensson, Acta Chem. Scand., **20**, 820 (1966).
6. Z. L. Awdeh, A. R. Williamson, B. E. Askonas, Nature, **219**, 66 (1968).
7. E. Velmet, Science Tools, **15**, 8 (1968).
8. H. Gerber, S. Barandun, Immunochemistry, **6**, 469 (1969).
9. J. L. Fahey, A. P. Horbett, J. Biol. Chem., **234**, 2645 (1959).
10. J. B. Fleischman, R. H. Pain, R. R. Porter, Arch. Biochem. Biophys., Suppl. **1**, 174 (1962).
11. J. Uriel, Bull. Soc. Chim. Biol., **48**, 969 (1966).
12. V. J. Lewis, M. O. Clark, Anal. Biochem., **6**, 303 (1963).
13. C. Wrigley, Science Tools, **15**, 17 (1968).
14. Z. L. Awdeh, Science Tools, **16**, 42 (1969).
15. D. Onica, Rev. roum. Biochim., **7**, 287 (1970).
16. I. Berggard, P. Peterson, în *Gamma-Globulins, structure and control of biosynthesis* (ed. by J. Killander) Almqvist et Wiksell, Stockholm and Intersci. Publ., New York—Londra—Sydney, 1967, p. 71.

EXTENT OF IMMUNOGLOBULIN LIGHT CHAINS HETEROGENEITY REVEALED BY ISOELECTRIC FOCUSING

SUMMARY

The rabbit *L*-chain could be separated by electrophoresis into 7—8 bands and by isoelectric focusing into 20 bands. The myeloma *L*-chain displaying 3 electrophoretic bands was focused into 5 bands in the gradient pH 3—10 and into 8—9 bands in the gradient pH 5—8. The urinary Bence-Jones protein, homogeneous by electrophoresis, presents 5 bands in the gradient pH 5—8.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 1, 39—48, (1971)

SISTEM INFORMAȚIONAL MODERN ÎN DOMENIUL BIOCHIMIEI

GEORGETA LĂZĂRESCU și V. EȘANU

Rezumat. — Se descriu principiul, construirea și folosirea unui sistem informațional modern, utilizabil în cercetări de biochimie.
Sistemul are ca scop corelarea trăsăturilor structurale chimice ale unor compuși activi cu proprietățile lor biochimice și biologice.
Experimentarea sistemului s-a făcut pe un număr de 150 de compuși organici, naturali sau de sinteză, experimentați de autori sau selectați din literatura de specialitate, cu activitate asupra procesului de multiplicare a virusurilor vegetale.

1. INTRODUCERE

Printre instrumentele noi, eficiente, de informare pe care informatica modernă le pune la dispoziția cercetătorilor se numără și sistemele informaționale axate pe compuși organici, organizate pe substructuri, adică pe fragmente structurale de diferite dimensiuni (de la grupe mari de atomi pînă la atomi). Asemenea sisteme, bazate în general pe metoda de indexare coordonată și pe cele mai variate tehnici de lucru — de la manuale la automatizate —, permit efectuarea unor corelări rapide între structură și diferitele activități sau proprietăți ale compușilor. Astfel de corelări sînt foarte utile în anumite domenii foarte importante de cercetare, ca farmacologia, biochimia, sintezele compușilor cu activități speciale (medicamente, fungicide ș.a.), spectrochimia ș.a., fapt pentru care sistemele de acest fel sînt utilizate larg pe plan mondial atît în Europa, cît și în S.U.A. [1] — [3].

Lucrarea de față descrie principiul, construirea și experimentarea unui sistem informațional modern, utilizabil în cercetarea de biochimie, avînd drept obiect un număr de 150 de compuși organici cu activitate asupra procesului de multiplicare a virusurilor plantelor, selectați pe baza literaturii de specialitate. Scopul sistemului este corelarea trăsăturilor structurale chimice cu proprietățile lor biochimice și efectele biologice corespunzătoare.

La baza indexului de coduri structurale chimice a stat un sistem de codificare a structurilor organice, elaborat în cadrul unei lucrări efectuate la Centrul de documentare științifică a Academiei R. S. România [3] — [5].

2. ELABORAREA SISTEMULUI

Sistemul, care se bazează pe principiul indexării coordonate, se compune din trei părţi esenţiale:

— un catalog de compuşi organici (pe fişe obişnuite);

— un index de coduri structurale chimice (pe fişe-termen cu selecţie manuală);

— un index de aspecte biologice (pe fişe-termen cu selecţie manuală).

Elaborarea sistemului a comportat următoarele etape de lucru:

2.1. Prelucrarea informaţiilor

Punctul de plecare în alcătuirea sistemului a fost o bibliografie cuprinzătoare în această problemă. S-au urmărit articolele respective, extrăgîndu-se atît denumirile compuşilor organici implicaţi în experienţe, cît şi toate aspectele biochimice şi biologice ale experimentelor. Aceste date de bază au fost în continuare prelucrate, compuşii organici fiind transpuşi în coduri structurale, iar aspectele biochimice şi biologice fiind exprimate prin termeni de indexare adecvaţi.

2.1.1. *Codificarea compuşilor organici.* Compuşii organici sînt reprezentaţi cu ajutorul unor coduri structurale „generale" şi „speciale", care permit punerea în evidenţă a:

— scheletului hidrocarbonat sau heterociclic de bază;

— grupelor funcţionale omogene şi eterogene;

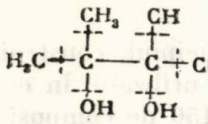
— nesaturării în catenă deschisă;

— sistemelor ciclice, în general, şi a sistemelor aromatice, în special;

— heteroatomilor incluşi în scheletul heterociclic.

Codul structural general este aplicabil, în principiu, la tot domeniul chimiei organice şi este alcătuit din fragmente structurale, însoţite fiecare de cîte un cod numeric general, avînd maximum trei cifre[1], care servesc la precizarea relaţiilor fragmentelor în moleculă, la indicarea ordinei lor de succesiune (modul de legare), a gradului de substituţie şi a numărului de apariţii.

Astfel, de exemplu, pinacolul se fragmentează după cum urmează:



C_2 061

C_1 114

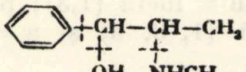
hidroxil 102

în care: C_2 reprezintă scheletul de bază, 0 indică substanţa de bază, 6 — 6 atomi de hidrogen substituiţi, 1 — o apariţie; C_1 reprezintă un substituent, 1 — substituent de ordinul I, 0 — nu are atomi de hidrogen substituiţi, 4 — are 4 apariţii; hidroxil reprezintă un substituent, 1 — substituent de ordinul I, 0 — nu are atomi de hidrogen substituiţi, 2 — are 2 apariţii.

[1] Codul numeric poate fi folosit la diverse nivele de specificitate (cu una sau cu două cifre), eventual complet eludat.

Fragmentele structurale pot fi catene aciclice liniare saturate, sisteme ciclice saturate, sisteme aromatice și heterociclice, grupe funcționale eterogene (—Hlg, — OH, — NH_2 etc.).

Un alt exemplu de aplicare a sistemului în trei variante de codificare, și anume cu trei și cu două cifre de cod (ultimele două) și fără nici un cod numeric:



Efedrina

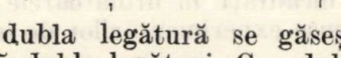
	I	II	III
C_3	031	C_3 31	C_3
benzen	111	benzen 11	benzen
hidroxil	101	hidroxil 01	hidroxil
amino	111	amino 11	amino
C_1	211	C_1 11	C_1

Pentru scopuri de cercetare se recomandă să se lucreze cu codul din varianta a II-a, cu o specificitate medie și mai simplu de aplicat.

Codurile structurale speciale servesc, în anumite cazuri, la completarea descrierii realizate cu codul structural general. Ele definesc următoarele elemente structurale:

a) *Nesaturarea în catenă deschisă.* Pentru a obține o evidență a dublelor și a triplelor legături carbon-carbon în catenă deschisă, se folosesc ca fragmente structurale: „dubla legătură" („dl") și „tripla legătură" („tl"), însoțite de un cod alfa-numeric, identic cu codul principal, modificat doar prin neutilizarea cifrei a doua, care se înlocuiește cu o liniuță, și prin adăugarea unei litere, care indică pozițiile reciproce ale dublelor (triplelor) legături dacă este cazul (c = legături conjugate; C = legături cumulate; i = legături izolate).

Exemplu de aplicare:

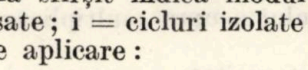


C_6 041
benzen 114
dl 0—5 C

în care: 0 — dubla legătură se găsește în substanța de bază, 5 — compusul are 5 duble legături, C — dublele legături sînt cumulate.

b) *Sisteme ciclice. Structura aromatică.* Pentru o evidență a sistemelor ciclice se folosesc ca fragmente structurale: „ciclu 3", „ciclu 4", „ciclu 5" etc., reprezentînd cicluri de 3, 4, respectiv 5 atomi etc., însoțite de un cod alfa-numeric special, format din 3(4) cifre, indicînd: nesaturarea sau structura aromatică, exprimată prin numărul de atomi de hidrogen introduși în ciclu față de numărul maxim de duble legături posibile, numărul de heteroatomi din scheletul ciclului, numărul de apariții ale ciclului respectiv, eventual, numărul total de cicluri în moleculă. Litera de la sfîrșit indică modul de joncțiune al ciclurilor (c = = cicluri condensate; i = cicluri izolate; s = sisteme spiranice).

Exemplu de aplicare:



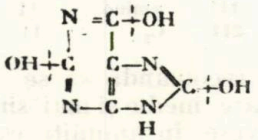
difenilmetan

C_1 021
benzen 112
ciclu 6 002 i

în care: 0 — ciclu aromatic, 0 — ciclul nu are heteroatomi, 2 — ciclul are două apariții, i — ciclurile sînt izolate.

c) *Heteroatomii incluşi în scheletul heterociclic.* Se înregistrează sub fragmente structurale, reprezentînd numele acestora, de exemplu „sulf heterociclic", „azot heterociclic" etc., însoţiţi de un cod afla-numeric special format din trei cifre, indicînd: tipul ciclului în care se găseşte heteroatomul, numărul heteroatomilor de altă natură existenţi în ciclu, numărul de apariţii al heteroatomului respectiv în moleculă. Litera de la sfîrşit permite, în anumite cazuri, o indicare a poziţiei heteroatomilor pe indicativele clasice: o = orto (1,2); m = meta (1,3); p = para (1,4); v = vicinală (1, 2, 3); s = simetrică (1, 3, 5) şi a = asimetrică (1, 3, 4).

Exemplu de aplicare:



purină 031
hidroxil 103
ciclu 6 021 c (0212 c)
ciclu 5 021 c (0212 c)
azot het 602 m
azot het 502 m

în care 502 m indică 5 — ciclu de 5 atomi, 0 — fără heteroatomi de altă natură, 2 — doi atomi de azot, m —poziţia meta (1, 3).

d) *Izomerii de poziţie şi stereoizomerii.* Anumite astfel de izomerii pot fi puse în evidenţă cu ajutorul unor termeni, reprezentînd indicativele clasice (*orto, meta, para, sim, vic, asim*) şi folosind termenii *cis, trans* sau simbolurile (+), (−), (±) în completarea descrierilor realizate cu codurile generale şi speciale menţionate mai sus.

2.1.2. *Indexarea aspectelor biologice.* Pentru descrierea aspectelor biologice legate de testarea compuşilor organici se folosesc o serie de termeni care pot defini fenomenul biologic studiat şi tipul de experiment. Aceşti termeni au fost încadraţi în următoarele categorii:

— virusuri — virusuri supuse experimentărilor de inhibare a multiplicării;

— plante — plantele-gazdă supuse experimentărilor;

— concentraţii — concentraţiile în care au fost experimentate substanţele organice active;

— momentul stropirii — momentul stropirii cu substanţe organice în funcţie de momentul inoculării cu virus;

— substanţe adăugate — substanţele adăugate compusului organic experimentat;

— tipul de element supus experimentului — fragmentul de plantă pe care se experimentează;

— efect — mărimea efectului asupra multiplicării virale obţinut în experiment,

— toxicitate — gradul de toxicitate a compusului organic faţă de plantă.

2.1.3. *Elaborarea catalogului de compuşi.* În urma prelucrării literaturii de specialitate s-au selecţionat 150 de compuşi organici, care au fost testaţi de unul sau de mai mulţi autori în privinţa activităţii asupra multiplicării virale. Aceşti compuşi fac parte, în principal, din următoarele

clase: acizi nesaturați, hidroxiacizi, aminoacizi, derivați trifenilmetanici, derivați ai purinei și pirimidinei. Ei constituie catalogul de compuși sub formă de fișe orînduit numeric, fiecărui compus acordîndu-i-se un număr în ordinea intrării în prelucrare.

În acest catalog, fiecare fișă reprezintă un compus și conține:

— numărul de ordine;

— denumirea compusului (după caz trivială, semirațională sau, chiar, rațională);

— formula structurală;

— codurile structurale conform sistemului descris mai sus;

— datele biologice ale experienței;

— adresa bibliografică:

	121
	2-metilbenzimidazol
	Efect asupra multiplicărilor
Benzimidazol 011	a) 10% stimulează 12%
Metil 101	Fără efect-netoxic
Ciclu 6 001(2)c	
Ciclu 5 021(2)c	b)50% Inhibă 11%
Azot het 502 m	Efect slab-netoxic
Schneider, Phytopath., 1954	

În cazul în care, pentru același compus, un autor sau diferiți autori au efectuat mai multe experiențe în condiții și cu rezultate diferite, pentru fiecare experiență s-a adăugat numărului compusului un indice alfabetic distinct (a, b, c etc.), care permite să se facă regăsiri separate ale diferitelor testări operate asupra aceluiași compus. La nevoie, pentru un compus se pot face mai multe fișe, toate purtînd același număr, cu indicatori alfabetici diferiți, în funcție de numărul experiențelor la care a fost supus.

Pe baza catalogului de compuși s-au alcătuit cele două indexuri, chimic și biologic, legătura dintre aceste părți componente ale sistemului făcînd-o numărul compusului, care este *unic* și reprezintă *adresa* pe baza căreia să poată fi regăsit compusul.

2.2. Înmagazinarea informațiilor. Elaborarea celor două indexuri (chimic și biologic)

La baza organizării sistemului stă, după cum s-a arătat, metoda de indexare coordonată [6]. În consecință, sistemul poate fi folosit cu toate tehnicile de lucru ale informării moderne. Noi am ales pentru acest experiment soluția cea mai simplă, și anume sistemul cu fișe-termen cu selecție manuală (STAS-8353/1969). O astfel de fișă cuprinde 10 coloane, intitulate de la 0 la 9:

FENIL									
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
10	1	32	93	4			27	218	19
20	11	142	253	34					39
60				64					109
190									

Numele termenului se trece în partea de sus a fişei, iar în cele 10 coloane se înscriu numerele documentelor, în cazul nostru al fişelor reprezentînd compuşii organici, după ultima cifră a numărului. Astfel, în coloana 1 se trec numerele 1, 11, 111, 1001 etc., în coloana 6 numerele 6, 16, 26, 116 etc.

Datele chimice şi biologice conţinute pe fişele de compuşi s-au înregistrat în cele două indexuri de coduri structurale şi de aspecte biologice, după cum urmează.

Pentru fiecare cod structural şi pentru fiecare aspect biologic exprimat în termenii încadraţi în categoriile de mai sus s-a alcătuit cîte o fişă-termen cu selecţie manuală cu 10 coloane, în care s-au înscris numerele tuturor compuşilor care conţin fragmentul respectiv şi care au fost implicaţi în acel aspect biologic. Pe fişele de termeni biologici, dacă a fost cazul, alături de numerele compuşilor s-au trecut şi indicatorii alfabetici.

Rezultatul înmagazinării a constat în:

— un index orînduit alfabetic, de 120 de fişe de coduri structurale;

— un index alfabetic, de 81 de fişe de aspecte biologice.

Menţionăm că aceste indexuri, conform principiilor indexării coordonate, nu vor creşte direct proporţional cu creşterea numărului de compuşi, deoarece o fişă din index reprezintă un termen (chimic sau biologic), iar numărul acestor termeni rămîne la un moment dat practic constant. Indexul pentru coduri structurale nu va depăşi un număr de cîteva sute, iar indexul biologic, 100—200 de fişe. În acest fel se vor putea prelucra mii de compuşi, cu un număr de fişe de ordinul sutelor.

3. MODUL DE UTILIZARE ŞI TESTAREA SISTEMULUI

Problemele sau întrebările pe care le poate rezolva un sistem de acest tip se pot exprima sub forma:

— unuia sau mai multor criterii biologice;

— unuia sau mai multor criterii chimice;

— unei combinaţii de criterii chimice şi biologice.

În toate cazurile, căutările se fac prin extragerea din indexurile respective, orînduite alfabetic, a fişelor-termen reprezentînd criteriile şi prin compararea numelor compuşilor care apar pe aceste fişe. Numerele care coincid pe fişe reprezintă răspunsul sau adresele compuşilor relevanţi sau presupuşi relevanţi pentru acea întrebare. Relevanţa reală se stabileşte ulterior, mergînd la catalogul de compuşi organici orînduit numeric.

Pentru testarea sistemului s-au formulat un număr de opt întrebări, care se încadrează în cele trei categorii de mai sus.

Pentru exemplificarea modului în care se lucrează cu acest sistem, analizăm în cele ce urmează două dintre aceste întrebări:

Întrebarea 1: Care sînt compuşii cu nucleu pirimidinic cu acţiune puternică asupra multiplicării virale?

Întrebarea presupune un criteriu chimic: „nucleu pirimidinic" şi unul biologic: „efect puternic".

Nucleul pirimidinic se reprezintă mai economic în indexul chimic prin codul structural special pentru heteroatomii heterociclici: „azot het 602 m", care desemnează toți compușii cu doi atomi de azot în poziția 1,3 într-un heterociclu cu 6 atomi fără heteroatomi de altă natură.

Efectul puternic este reprezentat în indexul biologic de către fișa-termen: „efect puternic (peste 50%)".

Confruntarea celor două fișe (fig. 1) ne conduce la următorul *răspuns*: — au fost testate 41 de substanțe cu nucleu pirimidinic;

— din cele 41 substanțe, numai 4 au avut un efect de inhibare puternic, și anume 8-azaguanina, 2,6-diaminopurinsulfatul; 8-azaadenina și 2-tiouracilul.

Se constată că, în afara nucleului pirimidinic comun, 3 dintre aceste substanțe mai au comun o grupă amino, iar alte două o grupă hidroxil.

Întrebarea 2: Care este funcția cel mai des implicată în acțiunea antivirală.

Este o întrebare generică, care poate fi rezolvată prin considerarea separată a doua criterii biologice: „efect puternic (peste 50%)" și „efect (15—20%)".

Prelucrarea analitică a rezultatelor la care conduc cele două criterii oferă observații foarte interesante pe baza frecvenței de apariție a fragmentelor atît funcționale, cît și de bază, în substanțele cu acțiune antivirală. Vom analiza numai substanțele cu „efect puternic (peste 50%)", în număr de 39. Iată observațiile:

— majoritatea acestor compuși fac parte din următoarele clase: acizi polivalenți, hidroxiacizi, aminoacizi, acizi nesaturați, cetoacizi;

o analiză a frecvenței de apariție a fragmentelor constitutive indică următoarea ordine: la *substanțele de bază*, cea mai mare frecvență o deține scheletul $C_3—C_4$ (apare de 25 ori din 39); la *grupele funcționale*, cea mai mare frecvență de apariție o are grupa *carboxil*, singură (6) sau asociată cu grupele *amino* (6), *hidroxil* (4), sau cu *o dublă legătură* (6).

4. CONCLUZII

Experimentul efectuat a demonstrat că sistemul propus permite:

a) sistematizarea compușilor în funcție de trăsăturile lor structurale în condiții deosebit de economice: cu un număr de cîteva sute de coduri structurale (respectiv fișe) se pot codifica și înmagazina mii și zeci de mii de compuși;

b) centralizarea pe o fișă de fragment structural a tuturor compușilor care conțin acel fragment;

c) posibilitatea de combinare rapidă (2—3 min) a unui număr oricît de mare de fragmente structurale și/sau trăsături biologice pentru găsirea compușilor care le conțin simultan;

d) furnizarea rapidă (cîteva minute) a unor informații și corelări de tipul: „frecvențele fragmentelor structurale în compușii cu anumite trăsături biologice".

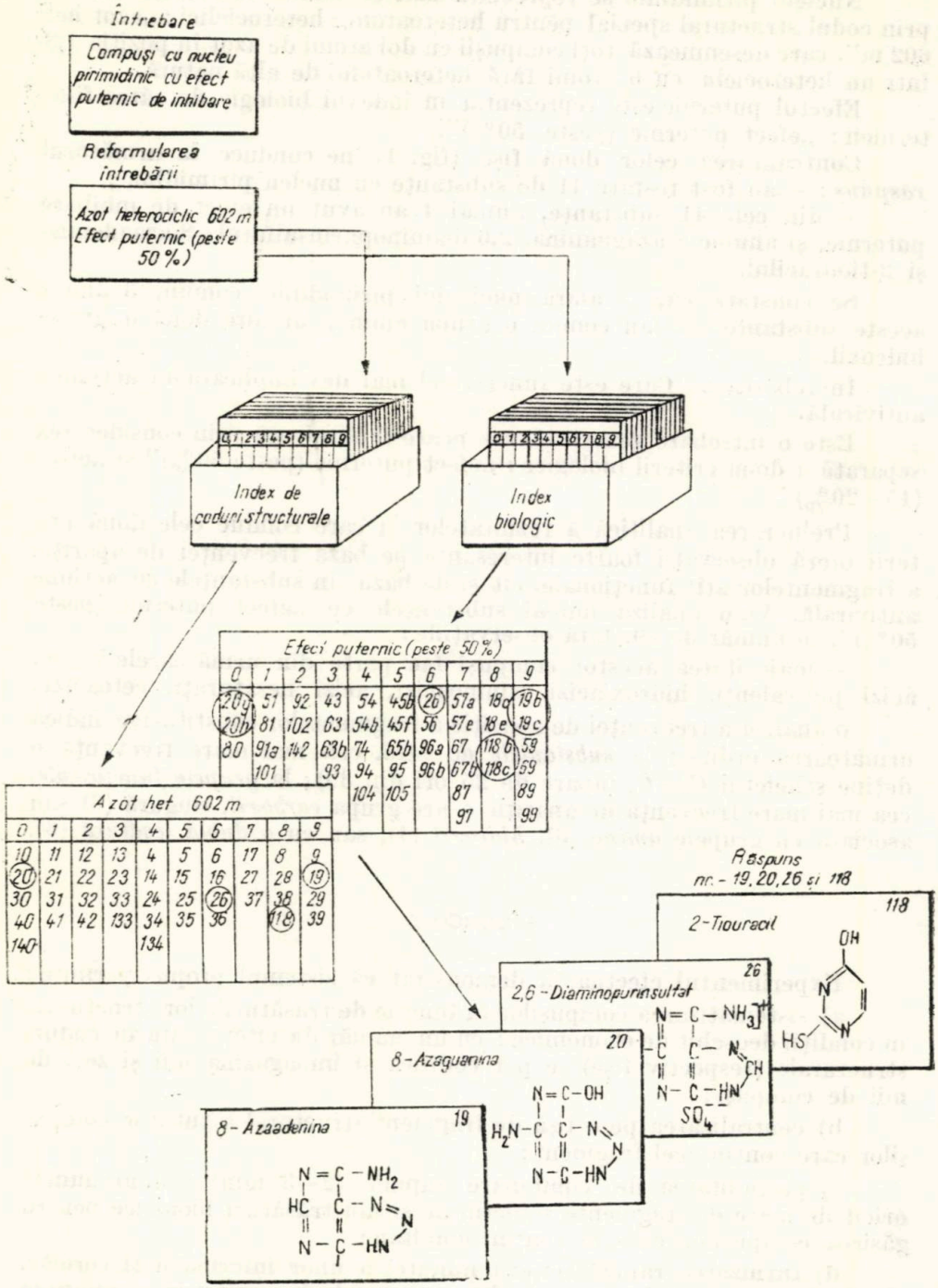


Fig. 1. — Exemplu de folosire a sistemului.

Avantajele aplicării acestui sistem sînt :

— posibilitățile inedite, nerealizabile cu instrumentele clasice de sistematizare, organizare și regăsire a compușilor prin intermediul trăsăturilor lor structurale predominante, al proprietăților (activităților) și al combinațiilor între ele. Asemenea corelări, imposibil de stabilit pe alte căi, sînt de multe ori neașteptate și pot conduce, în final, la soluții noi, la compuși noi cu efecte superioare, ajutînd direct la interpretarea datelor obținute atît pe baza literaturii de specialitate, cît și pe baza datelor experimentale personale ;

— introducerea unor sisteme informaționale moderne, larg răspîndite în străinătate, economice și eficiente, care pot fi ușor și imediat aplicate de către cercetători în activitatea curentă din cadrul institutelor de cercetare.

Experimentul descris în această lucrare a avut drept domeniu de aplicare substanțele cu activitate asupra multiplicării virusurilor vegetale și a folosit tehnica de lucru cea mai simplă dintre tehnicile informării moderne. Se înțelege însă că sistemul are posibilități largi de aplicare și în alte domenii sau probleme de cercetare, în care sînt utile corelările structură-activitate, iar tehnica de lucru poate fi oricare alta din cele uzuale în informarea modernă.

Prezentată la redacție la 24 aprilie 1970.

Centrul de documentare științifică
al Academiei R. S. România
și
Institutul de cercetări pentru
protecția plantelor
București

BIBLIOGRAFIE

1. — *Survey of Chemical Notation Systems. National Academy of Sciences*, Nat. Res. Council, 1964.
2. — *Survey of European Non-Conventional Chemical Notation Systems. National Academy of Sciences*, Nat Res. Council, 1965.
3. G. LĂZĂRESCU, St. cerc. doc., *2*, 99 (1969).
4. G. LĂZĂRESCU, Informatik, *1*, 22—23 (1970).
5. G. LĂZĂRESCU, St. cerc. doc., *2* (1970) (sub tipar).
6. G. LĂZĂRESCU, *Introducere în indexarea coordonată*, ed. 2, C.D.S., Academia R.S. România, București, 1969.

A MODERN INFORMATION SYSTEM IN BIOCHEMISTRY

SUMMARY

A modern information system is proposed and its principle, construction and use, for biochemical research, is described.

The aim of this system is the correlation of chemical structural characteristics of the active compounds with their biochemical and biological properties.

The system was experimented on 150 organic compounds of natural and synthetic origin, either by the authors or selected from the scientific literature, which have a certain activity upon the plant virus multiplication process.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 1, 49–55 (1971)

RIBONUCLEAZELE DIN MUȘCHI ÎN SERIA VERTEBRATELOR

CORINA IORDACHE

Rezumat. — S-a cercetat activitatea ribonucleazică (RN-azică) a mușchilor scheletici proveniți de la diferite clase de vertebrate (amfibii, reptile, păsări și mamifere), determinîndu-se pH-ul optim și activitatea specifică.

S-a constatat că activitatea nucleazică din mușchi este scăzută în comparație cu alte țesuturi. pH-ul optim „acid" se deplasează, pe măsura evoluției vertebratelor, de la 3,6 la 5,5, cu excepția clasei păsărilor. RN-aza „neutră" de pH = 7,0 există la toate vertebratele, cu excepția mamiferelor superioare unde este înlocuită cu RN-aza „alcalină".

Activitatea specifică cea mai mare apare la pH acid (5,0), iar în seria vertebratelor cercetate la mamifere. Cea mai scăzută activitate specifică o prezintă clasa păsărilor. Creșterea activității se observă în general corespunzător evoluției pe scara filogenetică a vertebratelor.

Se presupune că există o corespondență între activitatea nucleazică, calitatea acizilor nucleici și caracteristicile fiziologice ale mușchilor.

Din cercetările întreprinse pînă în prezent s-a desprins concluzia că evoluția proteinelor enzimatic active, studiată pe scară filogenetică, are un caracter conservativ. Această concluzie arată că enzimele, o dată constituite în procesul biochimic de formare și de diferențiere a materiei vii, au păstrat aceleași proprietăți catalitice generale pentru orice specie sau țesut de origine animală sau vegetală [1].

Deși funcția lor catalitică a rămas neschimbată, s-a relevat faptul că între aceleași enzime, provenite din diferite surse (clase, specii etc.), există unele diferențe de ordin structural sau din punctul de vedere al proprietăților lor fizico-chimice. În acest sens menționăm unele lucrări privind lactico-dehidrogenaza [2], aldolaza [3], chimotripsina [4], fosfagenfosfokinaza [5] și altele. Rezultatele obținute au conturat existența unor relații între evoluția biologică a viețuitoarelor și cea moleculară a materiei vii, subliniind importanța teoretică și practică a cercetărilor de biochimie comparată.

În acest context, ribonucleaza (RN-aza), ca enzimă care ocupă un loc important în metabolismul acizilor nucleici și în procesele de sinteză proteică, a fost relativ puțin studiată. Astfel menționăm unele lucrări privind structura primară a RN-azei provenite de la diferite specii animale, care au semnalat atît asemănări evidente, cît și o serie de diferențe în secvența de aminoacizi a enzimei [6]. Similitudinile observate în structura primară a RN-azei au dus la afirmația că pentru diferite

specii animale a existat un precursor unic, o origine comună a enzimei. De asemenea, recent, Wade şi Robinson [7] au determinat la 140 de bacterii distribuţia ribonucleazelor. Ei au constatat că diferitele specii de bacterii se diferenţiază atît prin conţinutul lor în RN-ază, cît şi prin anumite proprietăţi fizico-chimice ale enzimei, pH-ul optim de activitate fiind un criteriu destul de distinctiv pentru stabilirea unei taxonomii biochimice.

Pornind de la aceste indicaţii destul de sumare, am considerat că cercetarea ribonucleazelor din muşchii unor vertebrate situate pe diferite trepte de evoluţie biologică ar putea duce la unele constatări interesante din două puncte de vedere. În primul rînd, din punct de vedere evolutiv (în literatura care ne-a stat la dispoziţie nu am găsit lucrări în această direcţie). În al doilea rînd, dintre toate hidrolazele cunoscute, muşchiul posedă numai catepsina şi RN-aza acidă (localizată mai ales în lizozomi). Această RN-ază se pare că are un anumit rol în procesele de distrofie musculară.

De aceea, pentru obţinerea primelor date experimentale, am cercetat pH-ul optim de acţiune al RN-azelor musculare şi activitatea lor specifică, care ar putea furniza unele indicaţii privind caracterizarea proteinelor dotate cu activitate nucleazică din muşchii unor vertebrate, şi am analizat corespondenţa dintre aceste caracteristici biochimice şi evoluţia biologică a speciilor de vertebrate respective.

MATERIAL ŞI METODE

S-au folosit muşchii striaţi scheletici proveniţi de la următoarele clase de vertebrate: amfibii, reptile, păsări şi mamifere (broască, broască ţestoasă, porumbel, şobolan şi iepure). Ţesutul muscular, prelevat imediat după sacrificarea animalului, a fost spălat în soluţie fiziologică, uscat uşor pe hîrtie de filtru, mărunţit şi cîntărit.

Extracţia enzimei s-a făcut prin omogenizarea ţesutului într-un omogenizator Potter la rece, în apă distilată sau în zaharoză 0,25 M (1 :4). Omogenatul s-a lăsat o oră la rece (+4°C), apoi s-a centrifugat la 15 000 rot/min timp de 20 min (+4°C).

Supernatantul obţinut a fost folosit pentru determinarea activităţii RN-azice după indicaţiile lui Romeo şi Stagni [8]. S-au folosit soluţii-tampon de fosfat de sodiu-acid citric (Mc Ilvaine) şi de acid acetic-acetat de sodiu pentru valori de pH cuprinse între 3,6 şi 7,6. Absorbţia oligonucleotidelor acidosolubile s-a citit la un spectrofotometru VSU-2 la 260 mμ.

Concentraţia proteică a supernatantului s-a determinat prin metoda biuretului sau prin metoda Aldridge [9].

S-a folosit acid ribonucleic (Kepec, Siegburg).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În tabela 1 sînt redate valorile obţinute la determinarea pH-ului optim de activitate al RN-azei provenite din muşchii striaţi de amfibii, reptile, păsări şi mamifere.

Prima constatare care se desprinde din examinarea tabelei este că mușchii striați ai tuturor speciilor de vertebrate analizate prezintă activitate ribonucleazică. Această activitate este, după cum au arătat și Roth și Milstein [10], mai slabă decît în alte țesuturi, ca splină, rinichi și intestin, ceea ce se poate explica, de altfel, prin conținutul redus de acizi nucleici și prin intensitatea scăzută a sintezei proteice în țesutul muscular.

A doua constatare, care se referă la pH-ul optim de activitate al RN-azei, este că mușchii striați ai tuturor speciilor de vertebrate analizate posedă cel puțin o RN-ază „acidă" și una „neutră" sau „alcalină", evidențiindu-se deci existența unor RN-aze diferite.

Tabela 1

pH-ul optim și activitatea specifică a ribonucleazelor din mușchii striați ai unor specii de vertebrate

Animal	pH optim	Activitate specifică a RN-azei $E^{1,0\ cm}_{260\ m\mu}$ /mg proteină
Clasa *Amfibii*	3,6—4,0	0,030
Broască	5,6—6,0	0,007
	7,0	0,006
Clasa *Reptile*	4,6	0,016
Broască țestoasă	7,0	0,007
Clasa *Păsări*	4,0	0,012
Porumbel	5,6—6,0	0,007
Clasa *Mamifere*	5,0	0,048
Șobolan	7,0	0,010
Iepure	5,5	0,052
	7,5	0,010

Din aceeași tabelă se poate remarca poziția aparte pe care o au cele trei valori de pH obținute la mușchiul striat de broască (4,0; 6,0 și 7,0). Activitatea RN-azelor acestui mușchi, provenit de la un animal cu sînge rece, nu a putut fi comparată cu alte date similare din literatură obținute pe animale din aceeași clasă. Broasca țestoasă prezintă o RN-ază „acidă" (pH = 4,6) și una „neutră" (pH = 7,0), avînd astfel, prin RN-aza „neutră", un punct de tangență cu clasa amfibiilor. La mamifere, RN-aza „acidă" are un optim de activitate deplasat spre un pH în jur de 5,0; RN-aza „neutră", de pH = 7,0, apare numai la șobolan, în timp ce la iepure ea este înlocuită de o RN-ază „alcalină" de pH = = 7,5. Păsările prezintă doar două valori de pH acide, 4,0 și 5,6—6,0, constituind o excepție.

La datele obținute de noi am adăuga comunicarea de dată recentă a lui Meyer și Miller [11], precum că mușchiul de iepure posedă o RN-ază intracelulară de pH = 8,5, apoi lucrarea lui Abdullah și Pennington [12], în care se arată că mușchii striați de om au o RN-ază „acidă", de pH = 4,5—5,5, și una „alcalină", de pH = 9,5.

Se pare deci că, paralel cu evoluția pe scară filogenetică a vertebratelor, are loc o „deplasare" spre valori mai mari atît a pH-urilor „acide", cît și a celor „neutre" sau „alcaline" de activitate optimă a RN-azelor din mușchi. S-ar putea presupune în acest sens că, pe măsura evoluției vertebratelor, în mușchii lor au loc unele modificări fie la nivelul conținutului lor în acizi nucleici, fie în calitatea sau intensitatea proceselor de sinteză proteică. Această supoziție este întărită de concluziile unor cercetări care au arătat specificitatea de specie, de organ și chiar intracelulară a ARN-ului [13].

Din tabela 1 se mai constată că pentru mușchii tuturor speciilor activitatea specifică cea mai pronunțată se manifestă la un pH acid în jur de 5,0, fapt explicabil dacă ținem seama de observația lui Shibko și Tappel [14] că, în comparație cu alte organe, țesutul muscular conține, mai ales în lizozomi, destul de multă RN-ază acidă. De asemenea, la temperatura camerei sau la 37°C, acest pH acid favorizează o conversie lentă a RN-azei inactive la forma activă [15]. În fine, se știe că această RN-ază „acidă" nu este afectată de inhibitori naturali.

Comparînd mușchii de amfibii cu cei de reptile, se constată că mușchii de broască se disting prin activitatea lor specifică mare. Pentru mamifere, activitatea specifică cea mai mare o prezintă mușchii de iepure și apoi cei de șobolan. Este interesant de remarcat poziția aparte pe care o ocupă în seria vertebratelor mușchii de pasăre atît prin pH-ul optim de activitate mai scăzut, cît și prin activitatea specifică mai mică a RN-azei lor. Poate fi amintită, în legătură cu aceasta constatarea făcută de Șerban și Cotariu [2], care au arătat că repartiția izoenzimelor lactico-dehidrogenazei la pasăre este total diferită în comparație cu mamiferele. De altfel, variația activității specifice enzimatice corespunzător cu treapta de evoluție biologică a diferitelor vertebrate a fost regăsită de noi și într-un studiu privitor la distribuția RN-azei „acide" de pH = 5,0 pe fracțiunile subcelulare din mușchii acelorași vertebrate, ale cărui rezultate vor fi expuse într-o lucrare ulterioară.

Și Roth [16] a observat o diferențiere a unor specii de vertebrate pe plan biochimic, determinînd cantitatea de inhibitor natural al RN-azei „alcaline" extrase din ficat. Acest inhibitor se găsește în cantitate mare în extractele de ficat de mamifere și lipsește complet la pasăre și la broască. Atît Roth, cît și alți autori [17] consideră că el ar avea o mare importanță din punct de vedere evolutiv, dat fiind că el s-a găsit și la plante, fiind însă complet deosebit prin proprietățile sale chimice de cel de la animale. Se pare că absența lui la pasăre și la broască denotă un *turn-over* deosebit al ARN-ului sau o sinteză proteică aparte la aceste specii, spre deosebire de mamifere.

Indicațiile preliminare obținute de noi în această lucrare, precum că activitatea specifică a RN-azelor „acide" din mușchi crește pe măsura evoluției filogenetice a vertebratelor, cu excepția păsărilor, ca și indicațiile din literatură, arată că există premisele unor caracterizări mai profunde ale RN-azelor musculare provenite de la diferite specii, care pot aduce contribuții interesante în biochimia comparată.

De altfel, se cunoaște faptul că s-a izolat pînă în prezent o mare varietate de RN-aze din surse animale sau vegetale și chiar că diferite țesuturi ale aceluiași animal conțin diferite RN-aze [18], [19]. În această

direcție, unele date obținute de noi anterior în ceea ce privește speciile de acizi nucleici din diferiți mușchi striați de broască, care diferă între ei din punct de vedere biochimic și fiziologic, ca și determinările de activitate RN-azică la diferite pH-uri, atestă varietatea RN-azelor.

În tabela 2 sînt expuse pentru comparație cele două categorii de mușchi striați — tonici și atonici, — numărul de specii moleculare de ARN, pH-ul optim de activitate RN-azică și unele caracteristici fiziologice.

Tabela 2

Tipul de mușchi, numărul de specii moleculare de ARN, pH-ul optim de activitate ribonucleazică și unele caracteristici fiziologice ale mușchilor striați de broască

Mușchi striat broască	Tip (% fibre tonice)	Nr. specii moleculare ARN	pH optim al RN-azei $E^{0,5\ cm}_{260\ m\mu}$	Caracteristici fiziologice
Drept abdominal	Tonic (14%)	10	4,0 0,14 7,0 0,10	miofibrile puține contracții lente excitabilitate redusă
Gastrocnemian	Tonic (3%)	10	4,0 0,14 5,6 0,12 7,0 0,09	
Semimembranos	Atonic (0%)	7	4,0 0,10 6,0 0,14 7,0 0,12	miofibrile numeroase contracții rapide excitabilitate crescută
Sartorius	Atonic (0%)	6	4,0 0,13 6,0 0,11 7,0 0,12	

Din examinarea acestei tabele se evidențiază faptul că toți mușchii cercetați posedă activitate ribonucleazică. Se mai constată că toți mușchii posedă două RN-aze „acide" în afara mușchiului drept abdominal (mușchi tipic tonic), care prezintă doar o RN-ază „acidă" de pH = 4,0. Mușchiul gastrocnemian, care prin procentul de fibre tonice conținut (3%) ocupă o poziție de tranzit între mușchii tonici și cei atonici, posedă două RN-aze „acide" și o slabă activitate la pH = 7,0. În general, pe cînd mușchii tonici au o activitate RN-azică mai intensă la pH = 4,0, la cei atonici această activitate este mai crescută la pH = 6,0 sau 7,0.

Dată fiind repartiția diferită a speciilor de ARN în mușchii striați analizați de noi, probabil că există și o diversificare a nucleazelor respective, ceea ce ar denota o strînsă interdependență funcțională între enzimă și substrat. Cercetările cu privire la corespondența dintre activitatea nucleazică, calitatea acizilor nucleici (numărul și calitatea speciilor moleculare de ARN) și caracteristicile fiziologice ale mușchilor examinați, ar putea oferi date interesante atît pentru teorie, cît și pentru practică.

CONCLUZII

1. Mușchii striați ai speciilor de vertebrate studiate (amfibii, reptile, păsări și mamifere) prezintă activitate ribonucleazică, ceea ce confirmă evoluția cu caracter conservativ a nucleazelor.

2. pH-ul optim de activitate al RN-azelor din mușchi este diferit. pH-ul optim „acid" se deplasează, pe măsura evoluției vertebratelor, de la 3,6 la 5,5, cu excepția clasei păsărilor. Toate vertebratele cercetate conțin și o RN-ază „neutră" (pH = 7,0), cu excepția mamiferelor mai superioare (iepure, om), care posedă RN-aze „alcaline" (pH = 7,5—9,5).

3. Activitatea specifică cea mai mare se constată la pH acid (5,0). În clasa amfibiilor și reptilelor, cea mai mare valoare a activității specifice o prezintă mușchiul de broască. În toată seria vertebratelor examinate, activitatea specifică RN-azică cea mai înaltă a mușchilor striați o posedă mamiferele. Cea mai scăzută activitate specifică o prezintă mușchii striați de pasăre.

4. Creșterea activității nucleazelor din mușchi se face, în general, corespunzător evoluției pe scară filogenetică a vertebratelor studiate, cu excepția clasei păsărilor.

5. Se presupune că există o anumită corespondență între activitatea nucleazică, calitatea acizilor nucleici și caracteristicile fiziologice ale mușchilor.

Mulțumesc chim. Tr. Benția și tehn. A. Radu pentru asistența tehnică.

Prezentată la redacție la 8 octombrie 1970

Institutul de biochimie
București

BIBLIOGRAFIE

1. N. O. Kaplan, *Concepts and significance of enzyme evolution*, în *Homologous enzymes and biochemical evolution*, A colloquium organized under the auspices of advanced study group of NATO, Editors Nguyen van Thoai and Jean Roche, Gordon and Breach Science Publishers, New-York, Londra— Paris, 1968, p. 405.
2. M. Șerban, D. Cotariu, St. cerc. biochim., **12**, 173 (1969).
3. W. J. Rutter, Fed. Proc., **23**, 1248 (1964).
4. B. S. Hartley, J. R. Brown, D. L. Kauffman, R. B. Smillie, Nature **207**, 1157 (1965).
5. N. van Thoai, *Phosphagen phosphokinases homologues. Colloque sur l'évolution biochimique*, Paris, 1967.
6. A. Vegotsky, S. W. Fox, *Protein molecules: intraspecific and interspecific variations*, în *Comparative Biochemistry*, ed. M. Florkin, H. S. Mason, vol. IV, Academic Press, New York—Londra, 1962, p. 203.
7. H. E. Wade, H. K. Robinson, Biochem. J., **101**, 467 (1966).
8. D. Romeo, N. Stagni, G. L. Sottocasa, M. G. Pugliarello, B. de Bernard, F. Vittur, Biochim. Biophys. Acta, **130**, 64 (1966).
9. W. N. Aldridge, Biochem. J., **67**, 423 (1957).
10. J. S. Roth, S. W. Milstein, J. Biol. Chem, **196**, 489 (1952).
11. W. L. Meyer, L. Miller, VII Intern. Congress Biochem., Tokio, 1967, Abstracts V, p. 928.
12. F. Abdullah, R. J. Pennington, Clin. Chim. Acta, **20**, 365 (1968).
13. G. Brawerman, H. S. Shapiro, *Nucleic acids*, în *Comparative Biochemistry*, ed. M. Florkin, H. S. Mason, vol. IV, Academic Press, New York—Londra, 1962, p. 159.

14. S. Shibko, A. L. Tappel, Fed. Proc. Abstr., **23**, 842 (1964).
15. J. S. Roth, J. Biol. Chem., **231**, 1097 (1958).
16. J. S. Roth, Biochim. Biophys,. Acta, **61**, 903 (1962).
17. E. R. Scheggia, J. Trémolières, Compt. rend. Soc. Biol., **161**, 1521 (1967).
18. H. S. Kaplan, L. A. Heppel, J. Biol. Chem., **222**, 907 (1956).
19. G. W. Rushizky, A. E. Greco, R. W. Hartley Jr., H. A. Sober, J. Biol. Chem., **239**, 2165 (1964).
20. C. Iordache, S. Vasu, Rev. roum. Biochim., **6**, 4, 305 (1969).

MUSC LE RIBONUCLEASES IN THE SCALE OF VERTEBRATES

SUMMARY

Ribonuclease (RN-ase) activity in skeletal muscles coming from different vertebrate species (amphibia, reptiles, birds and mammals) by determining the optimum pH and the specific activity was studied.

Muscle nuclease activity is low as compared to other tissues. The optimum „acid" pH shifts, with vertebrate evolution, from 3.6 toward 5.5 (except for birds). The "neutral" RN-ase of pH 7.0 occurs in all vertebrates, excepti for higher vertebrates, where it is replaced by the "alkaline" RN-ase.

The highest specific activity occurs at an acid pH (5.0) and in the series of investigated vertebrates — in mammals. The lowest specific activity occurs în birds. The increase in activity generally corresponds to the phylogenetic evolution of vertebrates.

It is very likely that a correspondence exists between nuclease activity, quality of nucleic acids and physiological peculiarities of muscles.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 1, 57–61, (1971)

CANTITATEA ŞI CONCENTRAŢIA SUCURILOR OBŢINUTE DIN FRUNZE DE PORUMB, PRECUM ŞI DIN FRUCTE DE MĂR, PĂR ŞI GUTUI ÎNCĂLZITE LA TEMPERATURI RIDICATE

ANGELA MIHĂESCU

Rezumat. — După încălzire timp de o oră la temperaturi cuprinse între 40 şi 100°C şi readucere la temperatura laboratorului, frunzele de porumb şi fructele de măr, păr şi gutui dau prin stoarcere o cantitate sporită de suc în comparaţie cu frunzele şi fructele-martor care nu au fost încălzite.

În sucurile provenite din material vegetal încălzit, cantitatea substanţelor hidrosolubile o depăşeşte pe cea din sucurile-martor. Înseamnă că temperaturile ridicate provoacă destrămarea biostructurii şi eliberarea atît a apei, cît şi a substanţelor hidrosolubile care se găsesc integrate în ea.

Într-o lucrare precedentă [1] am arătat că frunzele de varză albă încălzite timp de o oră la temperaturi de la 50°C şi mai ales de la 70°C în sus şi readuse apoi la temperatura laboratorului dau prin stoarcere la 300 atm o cantitate mai mare de suc decît frunzele-martor. Am arătat de asemenea că, după încălzire la 40°C şi mai ales de la 70°C în sus, cantitatea de substanţe hidrosolubile din sucurile obţinute o depăşeşte cu mult pe aceea din sucurile-martor nesupuse unei încălziri prealabile. Aceasta înseamnă că de la 40°C în sus şi mai ales de la 70°C în sus începe eliberarea atît a apei, cît şi a substanţelor hidrosolubile din biostructura ţesutului foliar de varză.

Biostructura din frunzele de varză roşie s-a dovedit mai rezistentă la acţiunea temperaturilor mai ridicate decît la varza albă, destrămarea ei începînd de la 50°C şi mai ales de la 60°C în sus.

În continuare am extins aceste cercetări atît la ţesutul foliar al altor plante şi la porumb, cît şi la unele fructe de măr, păr şi gutui.

MATERIAL ŞI METODA DE LUCRU

Am lucrat pe frunze de porumb (*Zea mays hibrid* 409) în vîrstă de 20—25 de zile crescute în condiţii de laborator şi pe fructe de măr, păr şi gutui ajunse la maturitate de consum în felul următor.

Din frunzele de porumb se cîntăreau cîte 5 probe de cîte 50 g. Probele-martor (*A*) se ţineau la temperatura camerei de 20—22°C şi se storceau ca atare. Celelalte 4 probe (*B*) se introduceau în borcane cu

dop rodat şi se cufundau într-o baie marină, care apoi se încălzeau la temperaturi de 40, 60, 80 şi 100°C timp de o oră, după care se răceau la temperatura camerei şi se storceau cu o presă hidraulică manuală de laborator tip Hafico, model 2 l. Presiunea se ridica progresiv pînă la 150 atm şi se menţinea la această limită pînă cînd materialul înceta să mai dea suc. Astfel se obţinea, în funcţie de împrejurări, fie numai sucul vacuolar dacă frunzele rămîneau vii, fie sucul mixt dacă frunzele erau omorîte.

Fructele se tăiau fiecare în cîte 5 segmente egale şi se alcătuiau 5 probe de cîte 100 g, folosind pentru fiecare probă cîte un segment de la mai multe fructe din aceeaşi specie, apoi se proceda ca mai sus. Cantitatea de suc obţinut se măsura cu cilindrul gradat şi se exprima în ml, iar concentraţia lui globală se determina după centrifugare prin măsurarea indicelui de refracţie cu ajutorul refractometrului Abbé, model „Carl Zeiss"-Jena, şi se exprima convenţional în grame de zaharoză la 100 ml de suc, după tabelele lui Wagner [2]. Ţinînd seama de volumul sucurilor obţinute, se calcula apoi cantitatea totală de substanţe hidrosolubile conţinute în ele, exprimat în zaharoză.

REZULTATELE OBŢINUTE ŞI SEMNIFICAŢIA LOR

Unele dintre rezultatele cercetărilor efectuate pe frunze de porumb sînt prezentate în tabela 1. Se constată că frunzele proaspete nesupuse acţiunii temperaturilor ridicate şi cele care au fost încălzite la 40°C dau o cantitate relativ mică de suc care nu depăşeşte 17 ml pentru 50 g de frunze. Volumele de suc ce se storc din frunzele încălzite la temperaturi de 60°C şi mai sus dau cantităţi mai mari de suc, obţinîndu-se astfel 24—25 ml. Înseamnă că la aceste temperaturi biostructura se destramă, eliminînd apa cu diferite substanţe hidrosolubile care se adaugă la soluţia intracelulară.

Tabela 1

Volumul (ml), indicele de refracţie (*n*) şi concentraţia exprimată în zaharoză (g/100 ml) a sucurilor obţinute prin stoarcere la 150 atm a probelor de cîte 50 g de *frunze de porumb* neîncălzite (*probe A*) şi după încălzire timp de o oră a temperaturi diferite (*probe B*), precum şi cantitatea totală de substanţe dizolvate în sucuri, exprimat în zaharoză (g)

Data 1969	t°C	Vol. (ml)	Probele *A*				Probele *B*			
			n	Conc. zaharoză (g/100/ml)	Zaharoză totală (g)	t°C	Vol. (ml)	*n*	Conc. zaharoză (g/100/ml)	Zaharoză totală (g)
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
3 II	22	15,0	1,3379	3,3	0,49	40	16,5	1,3377	3,2	0,52
5 II	22	11,0	1,3372	3,8	0,30	60	24,0	1,3390	4,0	0,96
8 II	22	12,5	1,3366	2,4	0,30	80	25,0	1,3380	3,4	0,85
10 II	22	14,0	1,3381	3,4	0,47	100	24,0	1,3378	3,2	0,76

Compararea concentrațiilor sucurilor obținute din frunzele încălzite la temperaturi diferite, a cantităților de substanțe dizolvate în ele și a cantităților de suc arată că în condițiile în care am lucrat eliberarea apei și a substanței hidrosolubile din biostructură începe de la temperatura de 60°C în sus.

În cazul fructelor am ajuns la constatări asemănătoare cu cele obținute la frunze. Astfel, la mere, încălzirea pînă la temperaturi de pînă la 40°C inclusiv nu modifică în mod sensibil nici cantitatea de suc și nici concentrația acestuia (tabela 2). Începînd însă de la 60°C în sus, situația se schimbă: cantitatea de suc ce poate fi stoarsă aproape că se dublează față de aceea ce se obține din mere încălzite pînă la 40°C. De asemenea crește considerabil și cantitatea de substanțe hidrosolubile cuprinse în suc chiar dacă concentrația sucului rămîne practic aceeași

Tabela 2

Volumul (ml), indicele de refracție (n) și concentrația exprimată în zaharoză (g/100 ml) a sucurilor obținute prin stoarcere la 150 de atm a probelor de cîte 100 g de *fructe de măr* neîncălzite *(probe A)* și încălzite timp de o oră la temperaturi diferite *(probe B)*, precum și cantitatea totală de substanțe dizolvate în sucuri exprimat în zaharoză (g).

Data 1969	t°C	Volumul (ml)	n	Concentrația zaharoză (g/100 ml)	Zaharoză totală (g)
1	2	3	4	5	6
10 X	23	33	1,3480	10,3	3,39
14 X	26	30	1,3509	12,4	3,72
10 X	40	35	1,3479	10,3	3,60
14 X	40	36	1,3490	11,0	3,96
10 X	60	57	1,3479	10,3	5,87
14 X	60	47	1,3492	11,2	5,26
10 X	80	54	1,3500	11,8	6,37
14 X	80	53	1,3522	13,3	7,04
10 X	100	52	1,3495	11,4	5,92
14 X	100	53	1,3496	11,5	6,07

ca și în cazul temperaturilor mai joase. Înseamnă că, la mere, temperaturile de la 50°C în sus provoacă destrămarea biostructurii și că această destrămare se face la fel ca în cazul încălzirii la 100°C. Aceleași rezultate se obțin și la pere (tabela 3), de aceea nu insistăm asupra lor. La gutui însă se constată o sensibilitate mai mare a biostructurii față de temperaturile ridicate. Astfel, pe cînd la soiurile de mere și pere cercetate de noi destrămarea biostructurii începe de la 60°C în sus, la gutui multe dintre probele încălzite numai la 40°C dădeau o cantitate mărită de suc, asemănătoare cu aceea care se obține după încălzire la temperaturi mai ridicate. Alte probe încălzite de asemenea la 40°C ne dădeau aceeași cantitate de suc ca și probele neîncălzite. Înseamnă că fructele de gutui pot fi omorîte dacă sînt menținute timp de o oră la temperatura de 40°C (tabela 4). Pentru verificarea acestui rezultat, repetarea încercărilor cu gutui a confirmat rezultatele.

Tabela 3

Volumul (ml), indicele de refracție (n) și concentrația exprimată în zaharoză (g/100 ml) a sucurilor obținute prin stoarcere la 150 atm a probelor de cîte 100 g de *fructe de păr* neîncălzite (*probe A*) și încălzite timp de o oră la temperaturi diferite (*probe B*), precum și cantitatea totală de substanțe dizolvate în sucuri exprimat în zaharoză (g)

Data 1969	t° C	Volumul (ml)	n	Concentrația zaharoză g/100 ml)	Zaharoză totală (g)
1	2	3	4	5	6
25 IX	26	23	1,3499	11,7	2,69
,,	27	28	1,3475	10,0	2,80
,,	40	33	1,3474	9,9	3,26
,,	40	35	1,3476	10,1	3,53
,,	60	58	1,3478	10,2	5,91
	60	52	1,3462	9,1	4,73
,,	80	52	1,3475	10,0	5,20
,,	80	51	1,3478	10,2	5,20
,,	100	46	1,3483	10,5	4,83
,,	100	54	1,3480	10,3	5,56

Tabela 4

Volumul (ml), indicele de refracție (n) și concentrația exprimată în zaharoză (g/100 ml) a sucurilor obținute prin stoarcere la 150 atm a probelor de cîte 100 g de *fructe de gutui* neîncălzite (*probe A*) și încălzite timp de o oră la temperaturi diferite (*probe B*), precum și cantitatea de substanțe dizolvate în sucuri exprimat în zaharoză (g).

Data 1969	t°C	Volumul (ml)	n	Concentrația zaharoză (g/100 ml)	Zaharoză totală (g)
1	2	3	4	5	6
13 X	26	16	1,3485	10,7	1,71
18 X	25	17	1,3487	10,9	1,85
13 X	40	23	1,3475	10,0	2,30
18 X	40	45	1,3492	11,2	5,04
13 X	60	50	1,3502	11,9	5,95
18 X	60	61	1,3512	12,6	7,68
13 X	80	52	1,3483	10,5	5,46
18 X	80	57	1,3522	13,3	7,58
13 X	100	42	1,3495	11,4	4,78
18 X	100	57	1,3512	12,6	7,18

CONCLUZII

Biostructura frunzelor de porumb și a fructelor de măr, păr și gutui prezintă comportări asemănătoare față de acțiunea temperaturilor ridicate ca și frunzele de varză, și anume: începînd de la 40°C în sus la gutui, respectiv de la 60°C la frunzele de porumb, la fructele de măr și păr, biostructura se destramă, punînd în libertate apa și componentele hidrosolubile integrate în ea. Datorită acestui fenomen, atît

cantitatea de suc ce se obține din materialul preîncălzit, cît și cantitatea de substanțe hidrosolubile pe care acesta le conține depășesc cantitățile ce se obțin din materialul vegetal martor.

Prezentată la redacție la 31 august 1970

Universitatea București
Facultatea de Biologie,
Catedra de biochimie

BIBLIOGRAFIE

1. E. Macovschi, A. Mihăescu, St. cerc. biochim., **11**, 337 (1968).
2. B. Wagner, *Tabellen zum Eintauchrefraktometer*, Sondershausen, **8**, 46 (1907).

AMOUNT AND CONCENTRATION OF SAPS OBTAINED FROM MAIZE LEAVES AND FROM APPLE, PEAR AND QUINCE FRUITS HEATED AT HIGH TEMPERATURES

SUMMARY

After 1 hour heating at temperatures between 40° and 100°C and bringing back to room temperature, maize leaves as well as apple, pear and quince fruits yield, after squeezing, higher amounts of sap than control, non-heated leaves and fruits.

The amount of hydrosoluble substances in the saps resulted from heated vegetal material exceeds that in control saps. It results that high temperatures induce the biostructure breakdown and the release of water as well as of hydrosoluble substances, components of the biostructure.

ST CERC. BIOCHIM., 14, 1, 63–77 (1971)

POTENȚIALUL DE ACȚIUNE ȘI STAREA APEI NERVULUI DE BROASCĂ ÎN CAZUL ACȚIUNII DINITROFENOLULUI

FLORENTINA MOSORA

Rezumat. — S-au cercetat modificările potențialului de acțiune al nervului sciatic de broască și ale spectrelor RMN de înaltă rezoluție ale apei acestor nervi în cazul acțiunii dinitrofenolului. Spectrele RMN ale apei nervilor tratați cu DNP 5 mM timp de 9 — 10 min. (potențial de acțiune modificat) și timp de 20 min (excitabilitate abolită reversibil sau ireversibil arată față de spectrele RMN ale nervilor-martor modificări marcate. Pe de altă parte, după îndepărtarea inhibitorului, spectrele RMN ale apei acelorași nervi apar modificate față de cele inițiale, ale apei nervilor netratați.

În lumina teoriei biostructurii, aceste rezultate sînt interpretate în sensul că DNP modifică raportul dintre cantitatea de apă integrată în biostructura nervului și cantitatea de apă liberă din nerv. Sub acțiunea acestui inhibitor, cea dintîi scade, datorită destrămării parțiale a biostructurii, în favoarea apei libere, iar după îndepărtarea lui biostructura se reface, reintregrînd o parte din apa liberă, într-o altă ordonare decît cea inițială.

INTRODUCERE

Cercetările efectuate pe axonul gigant de *Sepia* și *Loligo* de către Hodgkin și Keynes [5] au arătat că, în prezența inhibitorilor metabolici (2—4 dinitrofenol, cianură, azidă), efluxul de sodiu și influxul de potasiu scad mult față de valoarea lor normală. Aceste fluxuri își revin la valoarea inițială dacă agenții citați sînt îndepărtați. Autorii au explicat rezultatele de mai sus formulînd ipoteza că, „alături de un sistem de permeabilitate care permite ionilor să se miște conform gradienților electrochimici în timpul activității electrice, există un mecanism secretoriu care expulzează sodiul și absoarbe potasiul, împotriva gradienților electrochimici" ([5], p. 60). Această explicație se bazează pe teoria membranei, după care în celula vie toată apa s-ar găsi în stare liberă și electroliții ar fi disolvați integral în ea ca ioni difuzibili.

În 1969 însă, Macovschi [13], [14] a dat o altă explicație rezultatelor experimentale ale lui Hodgkin și Keynes, bazată pe noua concepție a sa despre alcătuirea materiei vii, cunoscută sub denumirea de teoria biostructurii. După această teorie, în celula vie „apa protoplasmei vii (ansamblului protoplasmatic) se află sub trei forme diferite: o parte este integrată în biostructură (apa biostructurată sau apa asimilată) și nu are însușiri de solvent, o altă parte este legată de coloizi și structuri

(apa legată), în fine o parte se află în materia nevie a protoplasmei, formînd soluția intraplasmatică (apa liberă)" ([15], p. 60.) Scăderea efluxului de sodiu și a influxului de potasiu în prezența inhibitorilor este consecința modificării echilibrului de concentrație al ionilor respectivi între interiorul și exteriorul celulei: sub acțiunea dinitrofenolului (DNP), de exemplu, are loc o destrămare parțială a structurii particulare, caracteristică materiei vii — biostructura —, eliberîndu-se astfel apa, ionii și celelalte componente cuprinse pînă atunci în acea parte a biostructurii care s-a destrămat. După îndepărtarea inhibitorului însă, biostructura se reface, apa și celelalte componente eliberate sînt reintegrate în ea, ceea ce duce la restabilirea concentrațiilor ionice inițiale și deci a fluxurilor ionice.

În sprijinul ideii că inhibitorii metabolici provoacă eliberarea apei din biostructură au fost aduse rezultatele experimentale obținute pe frunzele vii de porumb de către Macovschi și Frunzeti [16]. Aceste rezultate demonstrează că frunzele tratate cu inhibitori metabolici în doze nemortale conțin mai multă apă liberă și mai multe substanțe hidrosolubile libere decît frunzele-martor sau cele tratate cu substanțe care nu frînează metabolismul, ca zaharoza și alanina.

Întrucît la materialul vegetal există deja o dovadă în sprijinul concepției menționate pe care teoria biostructurii o dă acțiunii DNP, ne-am propus să extindem cercetările de acest gen la nervul viu mielinizat, pentru a testa dacă și în acest caz inhibitorii metabolici provoacă modificări ale stării apei. Am ales ca material de studiu nervul sciatic de broască, ca inhibitor metabolic DNP, iar ca metodă de urmărire a stării apei rezonanța magnetică nucleară (RMN) de înaltă rezoluție.

Această din urmă metodă este foarte potrivită pentru studiul libertății de mișcare a moleculelor conținînd nuclee observabile (în cazul de față moleculele de apă care conțin nuclee de hidrogen), deoarece lărgimea semnalelor de rezonanță produse de aceste nuclee este dependentă de libertatea lor de mișcare [2], [6]. Lărgimea liniei este direct influențată de timpul de viață al nucleului observat în fiecare dintre stările de spin permise, timpul de viață fiind cu atît mai scurt, cu cît semnalul este mai larg. La rîndul său, timpul de viață al stării de spin depinde de mărimea și de frecvența distribuției cîmpurilor magnetice fluctuante în probă, care transferă nucleele dintr-o stare de spin într-alta. Cînd mișcările moleculare sau atomice sînt restrînse, ca în solide, cîmpurile magnetice generate de nucleele care precesionează (din tipul celor care trebuie observați) sînt maxime și au frecvența necesară pentru a produce un transfer maxim între stările de spin ale nucleelor respective. Aceasta duce la un timp de viață foarte scurt pentru fiecare stare de spin și la un semnal RMN foarte larg. Dacă libertatea de mișcare a moleculelor probei crește, mărimea, și frecvența cea mai probabilă a cîmpurilor combinate (precesie și rotație) se schimbă, astfel încît influența lor asupra nucleelor observate se reduce, iar timpul de viață al unei stări de spin crește. În consecință, dacă mobilitatea moleculelor probei crește, lărgimea liniei semnalului RMN descrește.

Cercetările efectuate pe materiale biologice diferite au arătat spectre RMN lărgite pentru protonii apei [1], [3], [18], [19]. Autorii acestor cercetări au interpretat rezultatele obținute în sensul că, în celula vie,

o parte a apei are un anumit grad de cristalinitate, găsindu-se deci într-o stare diferită de aceea a apei obișnuite. Lărgimea liniei semnalului RMN poate să crească, însă nu numai datorită structurii apei, ci și altor cauze, ca existența în probe a unor stări combinate solid-lichid care produc neomogenități magnetice sau prezenței în materialul de studiat a ionilor paramagnetici și a radicalilor liberi.

Numai cercetările efectuate pe mușchi [4] au elucidat problema, demonstrînd că lărgirea semnalului RMN în materialul viu se datorează restricției mișcării moleculelor de apă individuale și nu altor cauze posibile. Aceste rezultate au fost explicate conform ipotezei asociației inducției [7], — [12], după care în celula vie apa se găsește sub forma unor straturi multiplu polarizate, adsorbite pe proteinele celulare. Desigur, aceste spectre RMN lărgite care aduc dovada existenței în celula vie a apei cu un anumit grad de organizare infirmă ipoteza teoriei membranei, care consideră toată apa celulară liberă, însă ele nu explică efectele produse de inhibitorii metabolici asupra celulelor vii.

De aceea în lucrarea de față ne-am propus să cercetăm efectele produse de inhibitorul metabolic DNP asupra stării apei din nervul de broască prin studierea lărgimii liniei RMN a protonilor apei din nervul tratat și netratat cu inhibitor.

În vederea scopului propus, am considerat necesar, în primul rînd, studiul acțiunii diferitelor concentrații de DNP asupra potențialului de acțiune al nervului de broască. Aceste determinări le-am efectuat pentru alegerea concentrațiilor de DNP la care s-ar putea stabili paralelisme între funcționalitatea nervului de broască și a axonului gigant de *Sepia* și *Loligo*, deci la care ar fi interesant de urmărit eventualele modificări ale stării apei. În al doilea rînd, bazîndu-ne pe rezultatele obținute în primul caz, am studiat prin metoda spectrometriei de rezonanță magnetică nucleară de înaltă rezoluție schimbările produse în spectrele protonilor apei din nervul de broască sub acțiunea DNP și sub acțiunea a două substanțe care nu inhibă metabolismul zaharoza și alanina.

MATERIALE ȘI METODE DE LUCRU

Materiale. După disecție, nervii erau trecuți pînă la începerea experiențelor într-o soluție Ringer, avîndu-se grijă pentru păstrarea funcționalității fibrelor nervoase ca timpul de la scoaterea nervului din organism pînă la efectuarea experiențelor să fie cît mai scurt. Soluția Ringer a fost întrebuințată atît pentru imersarea nervilor, cît și ca solvent la prepararea celorlalte soluții întrebuințate : DNP, alanină, zaharoză.

2,4-dinitrofenolul a fost întîi dizolvat în NaOH diluat pentru a prepara o soluție 10 mM neutră, iar un volum potrivit din această soluție era diluat cu Ringer pentru a se obține soluții 0,02, 0,2, 2 și 5 mM.

Soluțiile de alanină și zaharoză s-au utilizat în concentrații de 5 mM.

Atît soluțiile de DNP, cît și cele de alanină și zaharoză au fost aduse la pH = 7,3—7,4, adăugîndu-li-se, după caz, bicarbonat de sodiu sau acid acetic.

Metoda electrică. Pentru testarea influenței DNP în diferite concentrații asupra stării funcționale a nervului, s-a urmărit în timp modificarea diferiților parametri ai potențialului de acțiune în funcție de concentrația inhibitorului. La fiecare experiență ne-am folosit de nervul drept și de cel stîng de la același animal, unul dintre ei fiind martor. Nervii au fost stimulați cu ajutorul unui stimulator cu două canale ST II B, care dădea impulsuri dreptunghiulare, cu amplitudine și durată reglabile. Potențialele de acțiune au fost culese cu ajutorul unor electrozi, amplificate, vizualizate și fotografiate de pe ecranul unui osciloscop catodic Krisik D 841. În general am lucrat la temperatura camerei (24°C), dar am efectuat experiențe și la 38°C, întrucît această temperatură putea fi atinsă în măsurătorile spectrometrice. Nu am constatat nici o modificare marcată a potențialelor de acțiune la această temperatură față de potențialele de acțiune obținute la temperatura camerei, ceea ce concordă și cu rezultatele obținute de Vasilescu, Portelli și Iliescu [20].

Metoda spectrometriei RMN de înaltă rezoluție. Spectrele protonilor apei din nervii normali și din cei tratați cu soluții de DNP, alanină și zaharoză le-am obținut la un spectrometru RMN de înaltă rezoluție Varian A-60 A. Așezarea nervului în tubul de probă s-a făcut prin două procedee:

A) un singur nerv în tubul de probă, fixat la un capăt de dopul superior al tubului, celălalt capăt putînd fi fixat de peretele tubului, astfel încît, în regiunea în care semnalul de rezonanță protonică era maxim, axa nervului lua mai multe orientări: de la direcția paralelă pînă la direcția perpendiculară față de cîmpul aplicat. Ca mediu de îmbăiere s-a folosit hexametildisiloxanul, care servea atît pentru a preveni evaporarea apei, cît și pentru obținerea unui mediu omogen în jurul nervului;

B) un singur nerv în tubul de probă fixat la ambele capete, astfel încît să aibă o poziție longitudinală centrală. Ca mediu de îmbăiere s-a folosit tot haxametildisiloxanul.

După trasarea spectrelor RMN inițiale, nervii eran scoși din tubul de probă și imersați în soluțiile dorite pentru perioada de timp cerută de experiență. Pentru trasarea unui nou spectru, erau scoși din soluția de experimentare și montați în tubul de probă, ca la momentul inițial.

Măsurarea lărgimii liniei spectrului RMN a fost făcută la jumătatea înălțimii [2], [6].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Acțiunea diferitelor concentrații de DNP asupra potențialului de acțiune al nervului. Rezultatele înregistrărilor potențialelor de acțiune la nervii tratați cu soluții de DNP de concentrațiile 0,02, 0,2, 2 și 5 mM sînt reprezentate în figurile 1—5.

Soluțiile de DNP de 0,02 mM nu influențează potențialul de acțiune al unui nerv de broască nici după 4 ore de imersare a acestuia în soluția amintită. Din figura 1 se observă că atît forma potențialului

de acțiune, cît și amplitudinea și viteza de conducere rămîn neschimbate în timpul celor 4 ore. Experiența nu s-a mai continuat, întrucît după acest interval de timp putea să se schimbe chiar și starea funcțională a nervului, ținut doar în soluția Ringer.

Soluția de DNP de 0,2 mM provoacă schimbări ale potențialului de acțiune al nervilor imersați pentru 75—100 min în această soluție (fig. 2 și 3). Astfel amplitudinea se micșorează la jumătate sau la o treime din valoarea inițială, viteza de conducere micșorîndu-se și ea. După acest interval de timp, menținerea nervilor în soluțiile cu concentrațiile amintite provoacă o micșorare și o modificare aproape totală a potențialului de acțiune, acesta distingîndu-se puțin față de linia izoelectrică sau dispărînd la timpi de imersare de 150—240 min. O parte din nervii cu potențialul dispărut prezintă, după spălarea cu soluție Ringer, o încercare de revenire, evidențiabilă prin apariția unui mic potențial de acțiune (fig. 3). La alți nervi, potențialul de acțiune nu mai apare nici după 30 min de imersare în Ringer. Nervul martor, care inițial prezenta un potențial de acțiune aproape superpozabil cu al nervului de experiență, nu prezintă nici o modificare a funcționalității sale în tot acest timp de imersare în Ringer.

Cercetările efectuate de Hodgkin și Keynes [5] arată că, în cazul axonului gigant de *Sepia* și *Loligo*, DNP în concentrație de 0,2 mM produce, după aproximativ 10 min de la aplicare, o inhibare marcată a fluxurilor de sodiu și de potasiu. Efluxul de sodiu scădea pînă la a 20-a parte din valoarea sa inițială în cursul a 90 min de acțiune a inhibitorului, iar influxul de potasiu scădea aproximativ de 8 ori în decurs de 70 min. După spălarea cu soluție Ringer, cele două fluxuri își recăpătau valoarea normală, dovedind că fenomenul descris era reversibil. În privința influenței DNP 0,2 mM asupra potențialului de acțiune, rezultatele noastre concordă cu cele obținute pe axonii giganți de *Sepia* și *Loligo*, întrucît autorii menționați arată că în cele 90 min de acțiune a inhibitorului nu există o pierdere a excitabilității nervului, ci doar o schimbare a potențialului său de acțiune.

Experiențele efectuate cu soluții de DNP mai concentrate, și anume de 2 și 5 mM (fig. 4,5), arată că deja după 9—10 min de tratare nervii prezintă aceleași modificări ale potențialului de acțiune ca cele observate în cazul DNP 0,2 mM după 75—100 min. După 20 min de imersare a nervilor în soluții de 2 și 5 mM, potențialul de acțiune dispare complet. Spălarea nervilor de experiență și reimersarea lor în soluție Ringer timp de 30—60 min, a dus în unele cazuri la reapariția unui mic potențial de acțiune, modificat față de cel inițial (fig. 5). Experiențele efectuate de Hodgkin și Keynes [5] au arătat că, în cazul unei concentrații de DNP mai mari de 0,2 mM (DNP 1 mM), excitabilitatea axonilor de *Loligo* nu era abolită nici după 30 min, în timp ce în cazul axonului de *Sepia* aceeași concentrație provoca o blocare reversibilă. Se pare deci că rezistența nervului de broască la acțiunea inhibitorilor metabolici este mai mare decît a axonului de Sepia; o comparație cu axonul de *Loligo* nu se poate face, deoarece cu acesta autorii citați n-au experimentat la concentrații atît de mari ca cele folosite de noi.

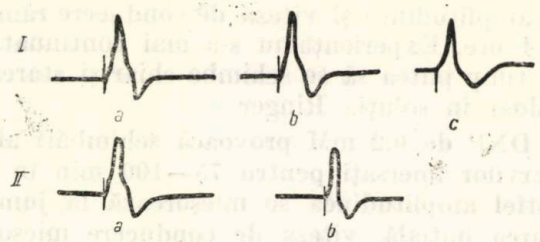


Fig. 1. — Acțiunea DNP 0,02 mM asupra potențialului de acțiune al nervului sciatic de broască.

I — Potențialul de acține al nervului sting imediat după disecție (*a*), după o oră de imersare în inhibitor (*b*) și după 4 ore de imersare în inhibitor (*c*); *II* — Potențialul de acțiune al nervului drept pereche imediat după disecție (*a*) și după 4 ore de imersare în Ringer (*b*). Condițiile de înregistrare ale tuturor potențialelor de acțiune au fost: tensiune = 10 V, durata = 0,05ms, frecvența = 40 Hz, întîrzierea = 3,5 ms.

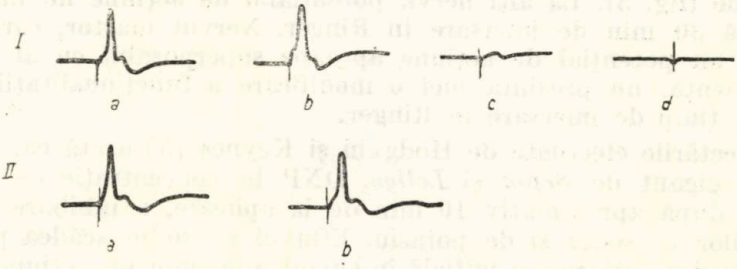


Fig. 2. — Acțiunea DNP 0,2 mM asupra potențialului de acțiune al nervului sciatic de broască.

I — Potențialul de acțiune al nervului sting imediat după disecție (*a*), după 50 min de imersare în inhibitor (*b*), după 215 min de imersare în inhibitor (*c*) și după 230 min de imersare în inhibitor (*d*) după ultimul timp de imersare potențialul dispare ireversibil; *II* — potențialul de acțiune al nervului drept pereche imediat după disecție (*a* și după 230 min de imersare în Ringer (*b*). Condițiile de înregistrare ale tuturor potențialelor de acțiune au fost: tensiune = 40V, durată = 0,07 ms, frecvența = 65 Hz, întîrzierea = 10 ms.

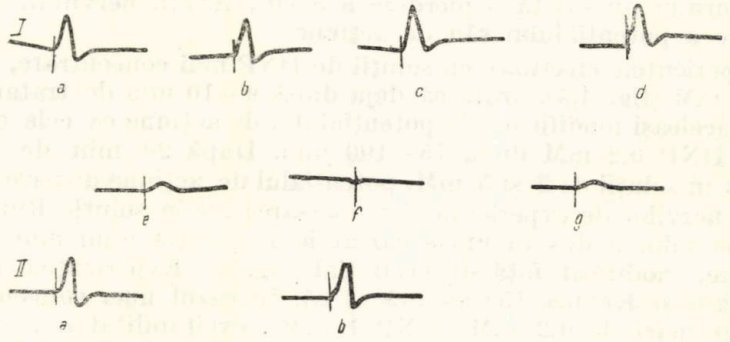


Fig. 3. — Acțiunea DNP 0,2 mM asupra potențialului de acțiune al nervului sciatic de broască.

I- Potențialul de acțiune al nervului sting imediat după disecție (*a*), după 15 min de imersare în inhibitor (*b*), după 30 min de imersarein inhibitor (*c*), după 45 min de imersare în inhibitor (*d*), după 90 min de imersare în inhibitor (*e*), după 150 min de imersare în inhibitor (*f*), și după spălare cu Ringer și reimersare în această soluție încă 30min (*g*); *II* — potențialul de acțiune al nervului drept pereche imediat după disecție (*a*) și după 180 min de imersare în Ringer (*b*). Condițiile de înregistrare ale tuturor potențialelor de acțiune au fost: tensiune = 115 V, durată = 0,055 ms, frecvența = 65 Hz, întîrzierea = 10 ms.

Din toate aceste experiențe referitoare la influența DNP în diferite concentrații asupra potențialului de acțiune al nervului efectuate în vederea alegerii concentrațiilor celor mai potrivite pentru studierea stării apei din nerv, se observă că este indicată folosirea DNP atît în

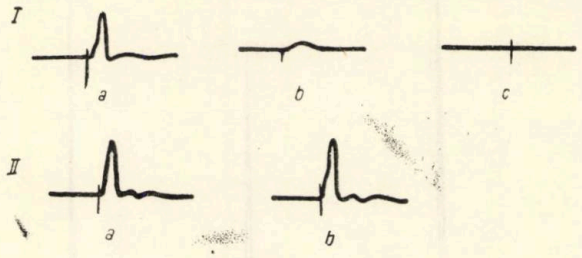


Fig. 4. — Acțiunea DNP 2 mM asupra potențialului de acțiune al nervului sciatic de broască.

I — Potențialul de acțiune al nervului sting imediat după disecție (*a*) după 10 min de imersare în inhibitor (*b*) și după 20 min de imersare în inhibitor (*c*); după ultimul timp de imersare în inhibitor potențialul dispare ireversibil; *II* — potențialul de acțiune al nervului drept pereche imediat după disecție (*a*) și după 20 min de imersare în Ringer (*b*). Condițiile de înregistrare ale tuturor potențialelor de acțiune au fost: tensiune = 15 V, durata = 0,04 ms, frecvența = 40 Hz, întîrzierea = 3,5 ms.

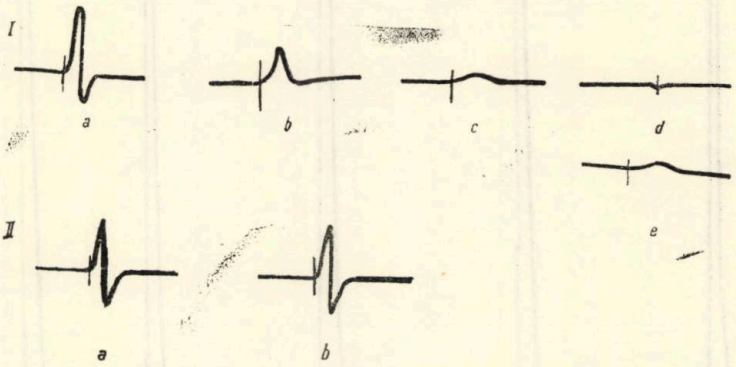


Fig. 5. — Acțiunea DNP 5 mM asupra potențialului de acțiune al nervului sciatic de broască.

I = Potențialul de acțiune al nervului sting imediat după disecție (*a*), după 9 min de imersare în inhibitor (*b*), după 14 min de imersare în inhibitor (*c*), după 18 min de imersare în inhibitor (*d*), și după spălare cu soluție Ringer și reimersare în această soluție încă 30 min (*e*); *II* — potențialul de acțiune al nervului drept pereche imediat după disecție (*a*) și după 50 min de imersare în Ringer (*b*). Condițiile de înregistrare ale tuturor potențialelor de acțiune au fost: tensiune = 15 V, durata = 0,04 ms, frecvența = 40 Hz, întîrzierea = = 3,5 ms.

concentrații de 2 și 5 mM, cît și de 0,2 mM, deoarece la toate aceste concentrații apar aceleași efecte, însă în perioade de timp diferite. Astfel au loc, pe de o parte, efecte primare, care produc modificări ale potențialului de acțiune (imersări de 75—100 min în DNP 0,2 mM și imersări de 9—10 min în DNP 2 sau 5 mM), și, pe de altă parte, au loc efecte secundare, care duc în cele din urmă la pierderea reversibilă sau ireversibilă a excitabilității (imersări de 150—240 min în DNP 0,2 mM și imersări de 20 min în DNP 2 sau 5 mM).

În cele ce urmează vom studia starea apei în nervul de broască în cazul producerii de către DNP a ambelor tipuri de efecte.

Acţiunea DNP asupra stării apei din nerv. Înainte de începerea experienţelor am efectuat cîteva determinări preliminare pentru a avea

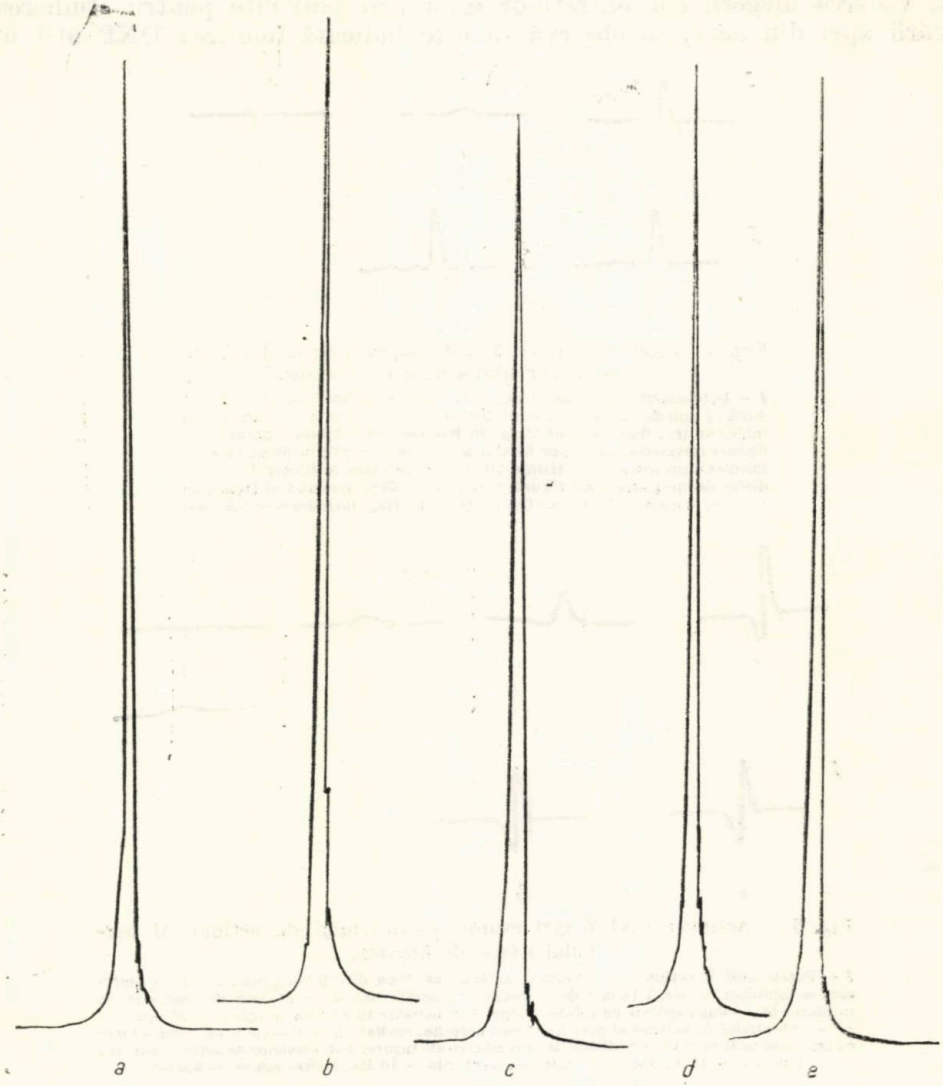


Fig. 6. — Spectrele RMN de înaltă rezoluţie pentru protonii : apei distilate (*a*), soluţiei Ringer (*b*), soluţiei DNP 5 mM (*c*), soluţiei alanină 5 mM (*d*), şi soluţiei zaharoză 5 mM (*e*). Lăţimea la jumătatea înălţimii 1,3 — 1,4 cps. Baleiajul 500 cps.

un etalon de comparaţie al lărgimii liniei de rezonanţă magnetică nucleară al protonilor apei din nerv. Astfel am trasat spectrul RMN al apei distilate (fig. 6*a*). Lărgimea liniei este de 1,4 cps, similară (1,3— —1,4 cps) cu lărgimea liniei RMN a protonilor apei din soluţia Ringer, din soluţia DNP 5 mM în Ringer, din soluţia de alanină 5 mM în Ringer şi din soluţia de zaharoză 5mM în Ringer (fig. 6*b*, *c*, *d*, *e*). Deci sub-

stanțele cu care am lucrat nu influențează lărgimea liniei RMN a protonilor apei obișnuite.

a) *Experiențe efectuate cu nervul în poziția A.* În comparație cu lărgimea redusă a spectrului RMN al protonilor apei libere, spectrul RMN al protonilor apei dintr-un nerv (montare în poziția *A*) are o lărgime de 6—7 ori mai mare (fig. 7). În plus, se observă că o dată cu schimbarea poziției nervului în tubul de probă (de la poziția paralelă la cea perpendiculară a axei nervului față de cîmpul aplicat), spectrul RMN își modifică forma, trecînd de la un dublet la o formă aproape de singlet. Aceasta dovedește că apa din nerv este într-o stare parțial orientată, nefiind izotropă ca apa normală.

Spectrele obținute sînt în concordanță cu cele efectuate de Chapman și McLauchlan [1], care au arătat că despicarea maximă a dubletului spectrului RMN al protonilor apei din nervul sciatic de iepure se observă atunci cînd axa nervului este paralelă cu cîmpul aplicat și zero atunci cînd axa nervului se găsește la un unghi de 54°44′ față de cîmpul aplicat.

Existența în nerv a unei ape cu un anumit grad de orientare, adică ale unei ape ale cărei molecule, fiind orientate, și-au pierdut din posibilitatea de a se mișca liber, este explicată de teoria biostructurii prin integrarea în biostructură a unei părți din apa și din celelalte componente care intră în alcătuirea lui. Desprinderea din biostructură, după anumite linii de minimă rezistență ([13]—[15]) a apei și a celorlalte componente integrate în ea sub acțiunea unor diverși factori fizici și chimici, atestă existența în biostructură a unei orientări a componentelor sale, deci și a apei cuprinse în ea.

Trebuie însă menționat că, întrucît, conform concepției biostructurii, pe lîngă apa integrată în biostructură (apa asimilată), care se poate elibera ușor din aceasta, în celulă mai există și apă legată (apă legată de coloizi și structuri), precum și apă liberă, semnalul RMN larg dat de protonii apei din nerv trebuie înțeles ca o suprapunere a semnalului fracțiunii de apă asimilată și al fracțiunii de apă legată, ambele posedînd un anumit grad de organizare, la care se adaugă și contribuția fracțiunii de apă liberă. Faptul că în spectrul RMN al protonilor apei apare numai un semnal lărgit (singlet sau dublet), care, în aparență, ar indica doar prezența apei cu un anumit grad de organizare (adică prezența apei asimilate și a celei legate), pe cînd semnalul îngust caracteristic apei libere lipsește, se poate explica în felul următor. Dacă moleculele apei organizate sau nucleele ei de hidrogen se schimbă repede cu moleculele apei libere din interior în timpi de ordinul celor în care are loc rezonanța nucleară, semnalul RMN rezultat va fi un singur pisc, cu o lărgime care reflectă media vecinătăților nucleelor de hidrogen. Cum apa liberă din interior are o proporție de aproximativ 10% față de apa totală restul fiind apă asimilată și apă legată [13],[17], media vecinătăților nucleelor de hidrogen este constituită în cea mai mare parte din mediul structurat al biostructurii și coloizilor, de unde și apariția unui spectru mult lărgit în comparație cu semnalul apei libere.

Din spectrele prezentate se mai poate observa existența unui pisc ascuțit (asemănător ca lărgime semnalului RMN al apei obișnuite) suprapus peste o ramură a dubletului (fig. 7). Întrucît acest pisc este pre-

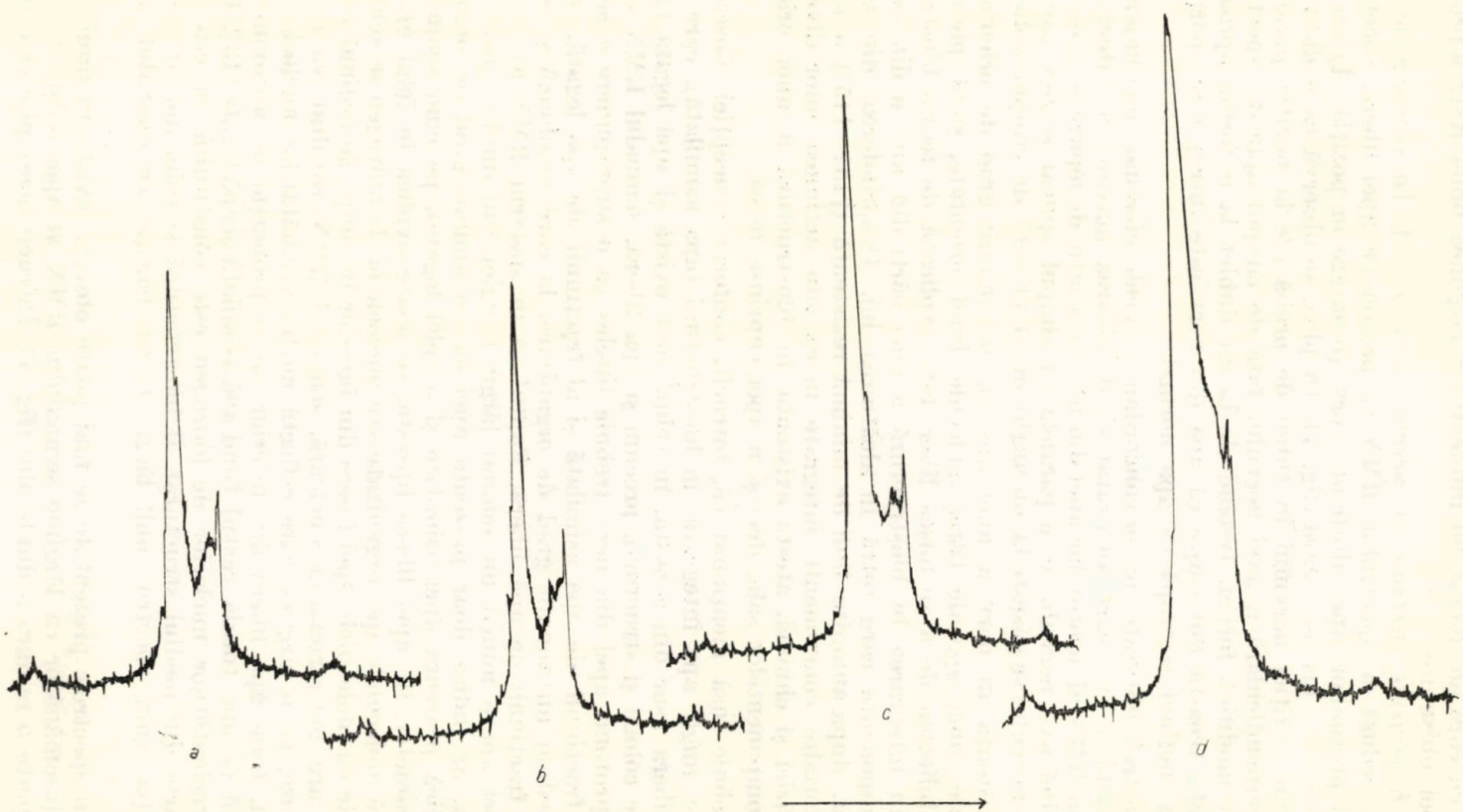


Fig. 7. — Spectrele RMN de înaltă rezoluţie ale protonilor apei dintr-un nerv luate pentru poziţii diferite ale axei nervului în tubul de probă. Aceste poziţii variau de la orientarea paralelă (*a*) pînă la cea perpendiculară (*d*) faţă de cîmpul aplicat. Baleiajul 500 cps.

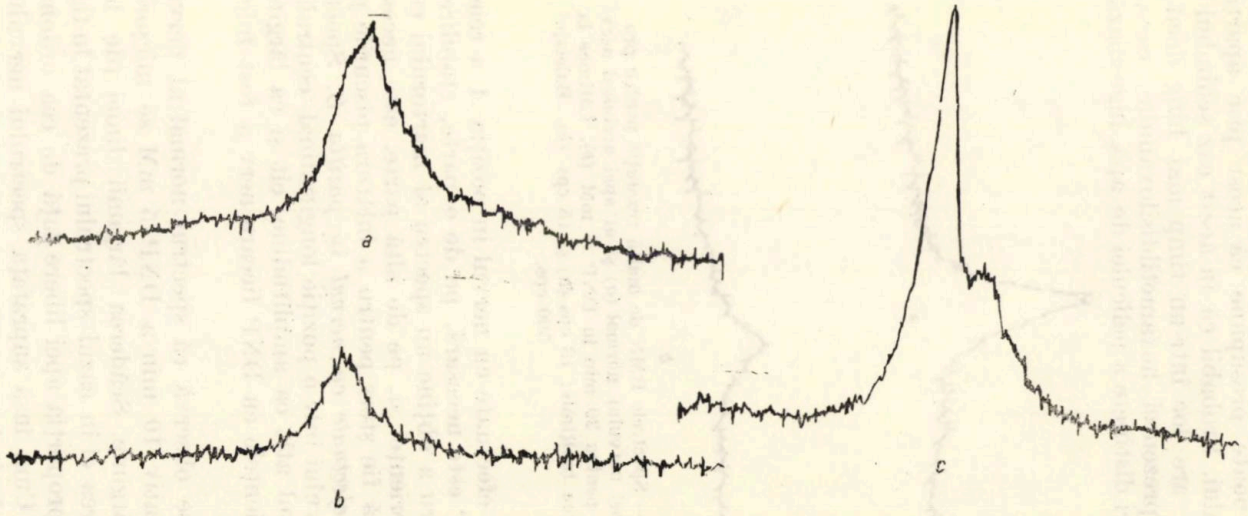


Fig. 8. — Spectrele RMN de înaltă rezoluție pentru protonii apei nervului normal (*a*) ai apei aceluiași nerv tratat 9—10 min cu DNP 5 mM (*b*) și ai apei aceluiași nerv spălat și reimersat în Ringer pentru 30 min (*c*). Lățimea la jumătatea înălțimii : 24 cps (*a*) și 12 cps (*b*). Baleiajui 500 cps.

zent în cazul spectrelor obținute de pe un nerv foarte umed care nu fusese șters pe hîrtie de filtru înainte de montarea în tubul de probă și întrucît piscul respectiv dispare în cazul spectrului unui nerv aproape uscat (fig. 8*a*), se poate presupune că acest pisc aparține apei libere din exteriorul nervului. Probabil că în acest caz schimbul protonic între interior și exterior are loc într-un timp mai lung decît timpul scării nucleare, datorită prezenței hexametildisiloxanului, care, producînd o delimitare în picături distincte a peliculei de apă, îngreuiază acest schimb.

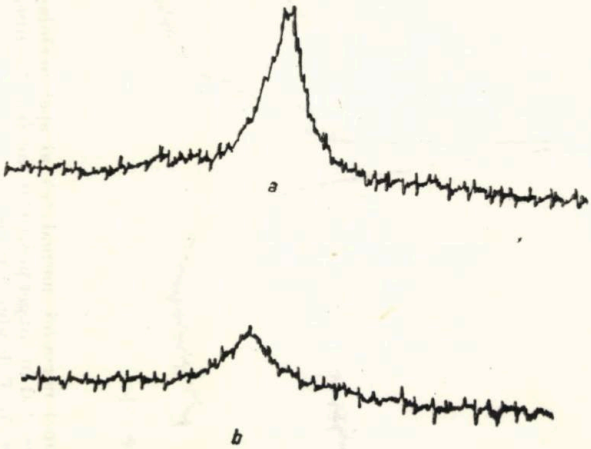


Fig. 9. — Spectrele RMN de înaltă rezoluție pentru protonii apei nervului normal (*a*) și ai apei aceluiași nerv imersat pentru 20 min în DNP 5 mM (*b*). Lățimea la jumătatea înălțimii: 13 cps (*a*) și 15 cps (*b*). Baleiajul 500 cps.

Din cercetările efectuate cu nervul în poziția *A* a reieșit că pentru studiul acțiunii DNP este necesară, pe de o parte, stabilirea unei poziții fixe a nervului pentru a obține un spectru al martorului care să nu varieze în timpul experienței și, pe de altă parte, este necesar ca înainte de montare nervul să fie șters pentru a înlătura piscurile parazite.

b) *Experiența efectuate cu nervul în poziția B.* Spectrele obținute în urma așezării nervului într-o poziție longitudinal centrală (*B*) variază de la un nerv la altul atît ca amplitudine, cît și ca lărgime. Din acest motiv, pentru experiențele cu DNP fiecare nerv a fost folosit și ca propriul său martor.

Din figura 8 se observă că spectrul normal al nervului în urma acțiunii de aproximativ 10 min a DNP 5 mM se micșorează mult ca amplitudine și ca lărgime. Scăderea lărgimii liniei (de la 24 cps la 12 cps), adică subțierea ei în cazul spectrului prezentat în figura 8*b*, dovedește că în interior proporția apei libere față de cea ordonată a crescut sub influența DNP. Cum însă suprafața spectrului nervului tratat este cu mult mai mică decît la nervul normal, adică cantitatea totală de apă din nerv a scăzut datorită ieșirii unei părți de apă în mediul exterior, rezultă că o parte din apa ordonată din interiorul nervului s-a eliberat sub influența DNP.

O spălare cu soluție Ringer și o imersare ulterioară a nervului pentru 30 min în această soluție duc la obținerea unui semnal mult crescut și schimbat față de spectrul inițial, deoarece își face apariția forma de dublet (fig. 8*c*). Compararea semnalului inițial cu cel final permite să se presupună existența unei orientări diferite a apei în cele două cazuri. Cantitatea de apă ordonată din nerv, micșorată datorită acțiunii DNP, a revenit la valoarea inițială o dată cu îndepărtarea inhibitorului prin spălare, însă ordonarea este acum diferită față de cea inițială, pentru că, deși poziția nervului față de cîmpul aplicat nu s-a schimbat, totuși spectrul inițial și cel final prezintă forme asemănătoare celor găsite la poziții diferite ale nervului față de cîmp (vezi experiențele cu nervul în poziția *A*).

Dacă timpul de imersare a nervului în soluția de DNP 5 mM se mărește pînă la 20 min, atunci spectrul RMN al protonilor apei se micșorează și mai mult, deosebindu-se foarte puțin de linia de zero (fig. 9). Lărgimea liniei s-a mărit de la 13 la 15 cps. Totuși se observă și aici că suprafața spectrului obținut la nervul imersat în DNP 5 mM 20 min este mult mai mică decît a aceluiași nerv imersat în Ringer, scăderea apei totale fiind mai mare decît cea produsă la 10 min de imersare în DNP 5 mM. Deci și în acest caz are loc o ieșire a apei din nerv, DNP producînd o micșorare a proporției apei libere din interior față de situația inițială. În cazul efectului secundar al DNP, cantitatea apei ordonate din nerv scade și mai mult, această scădere fiind proportională cu gradul de lezare al nervului. Întrucît DNP nu poate provoca eliberarea apei legate de coloizi și cu atît mai puțin a apei legate de structuri, rezultă că el acționează schimbînd raportul dintre apa liberă și cea cuprinsă în biostructură; adică la acțiunea inhibitorului cantitatea de apă asimilată scade, datorită destrămării parțiale a biostructurii în favoarea apei libere, în timp ce îndepărtarea lui provoacă refacerea biostructurii cu scăderea apei libere. De menționat că efectele primare ale DNP au ca rezultat eliberarea unei cantități de apă asimilată mai mici decît cea eliberată datorită efectelor secundare.

În fine, pentru a vedea dacă nu cumva schimbările produse de DNP în starea apei axoplasmei vii sînt întîmplătoare, s-a studiat acțiunea soluțiilor de alanină și zaharoză asupra nervilor imersați în ele. S-a observat că aceste soluții nu au nici un efect nici după 4 ore de acțiune. Deci destrămarea biostructurii și eliberarea apei asimilate din ea sub acțiunea DNP este un efect caracteristic inhibitorilor metabolici.

Mecanismul citat mai sus, evidențiat din interpretarea spectrelor RMN obținute, constituie deci dovada directă a concepției biostructurale cu privire la acțiunea DNP asupra celulelor vii.

CONCLUZII

1. În funcție de concentrația în care este folosit și de durata tratamentului, DNP poate exercita asupra nervului sciatic viu de broască efecte primare, caracterizate prin modificări ale potențialului de acțiune,

şi efecte secundare, caracterizate prin pierderea reversibilă şi ireversibilă a excitabilităţii.

2. Din studiul spectrelor RMN ale apei nervului sciatic viu de broască, înregistrate înainte şi după tratamentul cu DNP, reiese că atît în cazul efectelor primare, cît şi în cazul celor secundare are loc micşorarea cantităţii de apă ordonată din nerv şi ieşirea în mediul exterior a unei părţi din apa liberă a nervului.

3. Micşorarea cantităţii de apă ordonată din nerv şi ieşirea în mediul exterior a unei părţi din apa liberă a nervului sînt mai accentuate în cazul efectelor secundare decît în cazul celor primare.

4. Îndepărtarea inhibitorului care a provocat efectele primare are ca urmare refacerea cantităţii de apă ordonată din nerv, însă ordonarea acestei ape diferă acum de cea din nervul nesupus tratamentului cu DNP.

5. În lumina teoriei biostructurii, aceste rezultate sînt interpretate în sensul că DNP modifică raportul dintre cantitatea de apă integrată în biostructura nervului şi cantitatea de apă liberă din nerv. Sub acţiunea acestui inhibitor, cea dintîi scade, datorită destrămării parţiale a biostructurii, în favoarea apei libere, iar după îndepărtarea lui biostructura se reface, reintegrînd o parte din apa liberă, într-o altă ordonare însă decît cea iniţială.

Prezentată la redacţie la 28 octombrie 1970

Facultatea de biologie,
Universitatea din Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. Chapman, G., Mc Lauchlan, K. A., Nature, **215**, 391 (1967).
2. Emsley, J. W., Feeney, J., *High Resolution Magnetic Resonance Spectroscopy*, vol. 1, Pergamon Press.
3. Fritz, O. G., Swift, T. J., Biophys. J., **7**, 675 (1967).
4. Hazlewood, C. F., Nichols, B. L., Chamberlain, N. F., Nature, **222**, 747 (1969).
5. Hodgkin, A. L., Keynes, R. D., J. Physiol., **128**, 28 (1955).
6. Kavanau, J. L., *Water and Solute-Water Interactions*, Holden Day, Inc., San Francisco, 1964, p. 39.
7. Ling, G. N., Am. J. Phys. Med., **34**, 89 (1955).
8. Ling, G. N., *A Physical Theory of the Living State*, Blaisdell, New York, 1962.
9. Ling, G. N., Fed. Proc., **24**, S103 (1965).
10. Ling, G. N., Ochsenfeld, M. M., Biophys. J., **5**, 777 (1965).
11. Ling, G. N., Ann. N. Y. Acad. Sci., **125**, 401 (1965).
12. Ling, G. N., Int. Rev. Cytol., **26**, 1 (1969).
13. Macovschi, E., St. cerc. biochim., **12**, 5 (1969).
14. Macovschi, E., St. cerc. biochim., **12**, 105 (1969).
15. Macovschi, E., *Biostructura*, Edit. Acad. Bucureşti, 1969.
16. Macovschi, E., Frunzeti, V., St. cerc. biochim., **12**, 19 (1969).
17. Mosora, F., St. cerc. biochim., **13**, 291 (1970).
18. Odeblad, E., Bhar, B. N., Arch. Biochim. Biophys., **63**, 221 (1956).
19. Sussman, M. V., Chin, L., Science, **151**, 324 (1966).
20. Vasilescu, V., Portelli, C., Iliescu, R., St. cerc. fiziol., **13**, 125 (1968).

ACTION POTENTIALS AND WATER STATE IN FROG NERVES, UNDER THE ACTION OF DINITROPHENOL

SUMMARY

The modifications of the action potential of the frog sciatic nerves and of high resolution NMR spectra of water in these nerves were investigated in the case of dinitrophenol action. NMR spectra of the water occurring in nerves treated with 5 mM DNP for 9—10 min (modified action potential) and for 20 min (reversibly and irreversibly abolished excitability) show marked differences as compared to NMR spectra of control nerves.

On the other hand, after inhibitor removal, NMR spectra of the water of the same nerves are changed as compared to the initial ones (NMR spectra of the water of untreated nerves).

Considering these results in the light of the biostructure theory, the conclusion can be drawn that DNP changes the ratio between the amount of water integrated into the biostructure of nerves and the amount of free water in nerves. Under the action of this inhibitor, the former diminishes, owing to the partial breakdown of the biostructure, in favour of free water. After removing the inhibitor the biostructure is restored, reintegrating a part of the free water, but in a different order than the initial one.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 1. 79–83 (1971)

ELIBERAREA PROTEINELOR DIN BIOSTRUCTURA UNOR FRUNZE SUB ACȚIUNEA INHIBITORILOR METABOLICI

MARIA RABEGA

Rezumat — Cantitatea de suc și concentrația în substanțe proteice care s-a determinat prin stoarcerea frunzelor de porumb și grîu tratate cu inhibitori metabolici au arătat că frunzele tratate cu inhibitori eliberează o cantitate de suc și de substanțe proteice mult mai mare decît frunzele martor.

După omorîrea materialului biologic se obține o cantitate sporită de suc și de proteine din frunzele-martor. Aceasta dovedește că inhibitorii metabolici produc o destrămare parțială a biostructurii cu eliberare de apă și de proteine, iar prin omorîre biostructura frunzelor cercetate se destramă, eliberînd atît apa, cît și substanțele proteice.

Printr-o lucrare apărută recent [1] s-a adus dovada experimentală a existenței proteinelor în alcătuirea biostructurii, folosindu-se ca agent de destrămare a acesteia ridicarea temperaturii.

Inhibitorii metabolici, atît 2,4 — dinitrofenolul, cît și azida de sodiu, introduși în țesuturile vii, provoacă o destrămare a biostructurii, procesul fiind parțial și reversibil atîta timp cît intensitatea acțiunii inhibitorului nu depășește o anumită limită [2].

În acest scop lucrarea de față a urmărit să stabilească :

— dacă, în procesul de destrămare a biostructurii sub acțiunea inhibitorilor metabolici, printre substanțele hidrosolubile care se eliberează se găsesc și proteinele ;

— dacă eliberarea lor are loc o dată cu apa și

— dacă cantitatea de suc plasmatic obținută prin stoarcerea reziduului frunzelor-martor omorîte cu cloroform va fi mai mare și va conține o cantitate sporită de proteine față de cantitatea de suc și de proteine care se obține prin stoarcerea reziduurilor omorîte rămase de la frunzele tratate cu inhibitori metabolici, conform prevederilor teoriei biostructurale.

Pentru a verifica aceste presupuneri era necesar să se măsoare cantitățile de suc care se obțin din țesuturile vegetale proaspete tratate cu inhibitori metabolici și cele obținute după omorîrea reziduului, să se determine concentrația în substanțe proteice a acestor sucuri și să se compare rezultatele obținute cu probele martor.

MATERIAL ȘI METODĂ DE LUCRU

Cercetările experimentale le-am efectuat pe frunze de plantule de porumb (H.S. 301) și pe frunze de plantule de grîu (*Triumph*) după 14 zile de la însămînțare și creștere în condiții de seră. Ca inhibitori metabolici am

folosit 2,4-dinitrofenolul și azida de sodiu, în soluții apoase de concentrația 10^{-3} M, respectiv 10^{-2}M. Introducerea inhibitorilor metabolici, și a apei (proba-martor) în frunzele plantulelor s-a efectuat prin metoda vacuum-infiltrației [3] în probe de cîte 50 g frunze. Imediat după infiltrare și uscare prin tamponare cu hîrtie de filtru, frunzele se storceau la o presă de laborator tip Hafico, model 21. Presiunea se ridica treptat la 150 at și se menținea pînă la încetarea scurgerii sucului.

Reziduurile obținute după stoarcerea frunzelor proaspete erau ținute apoi timp de 24 de ore într-o atmosferă de vapori de cloroform pentru omorîrea țesutului. După aceea se storceau în presă în aceleași condiții ca și frunzele proaspete. Cantitățile de suc obținute, se măsurau cu cilindrul gradat și apoi se centrifugau timp de 20 min la 3 000 ture/min. După diluarea sucurilor în proporție de 1 : 40 pentru sucurile de porumb și sucul plasmatic de grîu și de 1 : 5 pentru sucul vacuolar de grîu și pentru cel obținut din grîu după tratarea cu inhibitori, într-o parte alicotă s-au determinat substanțele proteice după metoda Lowry [4], cu modificarea dată de Miller [5].

Citirile s-au efectuat la spectrocolorimetrul Spekol, model „Carl Zeiss"-Jena, iar concentrațiile în proteină (mg/100 ml de suc și la cantitatea de suc stoarsă) s-au calculat după o curbă-etalon determinată cu o soluție standard de albumină bovină serică.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Din tabela 1 se constată că volumul sucurilor obținute din frunzele de porumb tratate cu inhibitori este cam de 2 ori mai mare decît al sucurilor obținute din frunzele-martor. Această diferență este determinată de faptul că inhibitorii metabolici, provocînd destrămarea parțială a bio-

Tabela 1

Cantitatea de suc (ml) și cantitatea de proteine în mg obținută prin stoarcerea la 150 at a probelor de cîte 50 g de frunze de porumb proaspete, infiltrate prin vacuum cu soluții de 2,4 - dinitrofenol (DNP) și azidă de sodiu (NaN_3) de concentrație 10^{-3} M, respectiv 10^{-2}M față de proba-martor infiltrată cu apă

Suc, ml			Concentrația în proteină mg/100 ml de suc			Cantitatea de proteine în mg găsite în sucul obținut prin stoarcere		
H_2O	DNP	NaN_3	H_2O	DNP	NaN_3	H_2O	DNP	NaN_3
20	34	38	452	684	832	90,4	242	316
19	29	36	456	760	852	86,6	220	307
16	30	34	500	748	916	80,0	224	311
18	32	35	472	716	900	84,9	229	315
17	33	34	476	700	884	80,9	231	301
16	32	36	484	732	864	77,4	234	311
18	29	33	464	776	916	83,5	225	302
17	30	34	496	772	904	84,3	232	307
16	31	35	480	752	892	76,8	233	312
18	30	38	468	764	840	84,2	229	319

structurii, eliberează o parte din apa integrată în biostructură care se adaugă la sucul vacuolar.

Cantitatea de proteine găsită în sucul frunzelor tratate cu 2,4-dinitrofenol este cam de 5 ori mai mare și cam de 7 ori mai mare în cazul tratării frunzelor cu azidă de sodiu față de cantitatea de proteine găsită în sucul frunzelor martor. Aceste creșteri ale cantității de proteine se datoresc faptului că inhibitorii metabolici menționați eliberează proteine din biostructura destrămată parțial, care se adaugă la cantitatea de proteine din sucul frunzelor martor.

Cercetînd datele din tabela 2, se constată că după omorîrea reziduului cu cloroform volumul sucurilor plasmatice obținute din frunzele martor este cam de 2 ori mai mare decît cel al sucurilor plasmatice obținute prin stoarcerea reziduului rămas de la frunzele infiltrate cu inhibitori metabolici.

Tabela 2

Cantitatea de suc (ml) și cantitatea de proteine în mg obținută din rezidurile rămase după stoarcerea celor 50 g de frunze proaspete de porumb infiltrate prin vacuum cu apă (proba-martor) și cu soluții de 2,4-dinitrofenol (DNP) și azidă de sodiu (NaN_3) după prealabila omorîre cu cloroform timp de 24 de ore

Suc, ml			Concentrația în proteină mg/100 ml de suc			Cantitatea de proteine în mg găsită în sucul obținut prin stoarcere		
H_2O	DNP	NaN_3	H_2O	DNP	NaN_3	H_2O	DNP	NaN_3
26	12	10	1020	900	748	275	108	74,8
23	12	11	1096	916	624	252	110	68,6
23	13	12	1112	840	640	256	109	76,8
24	14	13	1084	792	608	260	111	79,0
25	15	10	1068	776	652	267	116	65,2
24	14	14	1088	748	592	261	105	82,8
24	14	11	1036	760	676	249	106	74,3
24	13	11	1112	772	684	267	100	75,2
22	16	10	1144	716	700	252	115	70,0
25	15	10	1052	732	716	263	110	71,6

Această creștere a volumului sucurilor obținute prin stoarcerea frunzelor martor se explică prin faptul că la frunzele infiltrate cu inhibitori metabolici o parte din apa asimilată s-a eliberat prin destrămarea parțială a biostructurii înainte de omorîrea țesutului vegetal.

Cantitatea de proteine din sucul plasmatic obținut după omorîrea reziduului frunzelor de porumb utilizate ca martor este de aproape 4 ori mai mare decît în sucul obținut din reziduul frunzelor infiltrate cu azidă de sodiu și cam de 3 ori mai mare decît în cazul infiltrării cu 2,4-dinitrofenol. Aceste creșteri se explică prin aceea că în cazul frunzelor infiltrate cu inhibitori, în urma destrămării parțiale a biostructurii, o parte din proteinele integrate în biostructură au fost eliberate o dată cu primul suc obținut prin stoarcere.

Datele obținute în urma cercetărilor efectuate pe frunzele de grîu sînt introduse în tabelele 3 și 4.

Comparîndu-le cu rezultatele din tabelele 1 și 2, se constată că ele indică aceleași fenomene care au fost observate și în cazul frunzelor de

Tabela 3

Cantitatea de suc (ml) și cantitatea de proteine în mg obținută prin stoarcere la 150 at a probelor de cîte 50 g de frunze proaspete de grîu infiltrate prin vacuum cu soluții de 2,4-dinitrofenol (DNP) și azidă de sodiu (NaN_3) de concentrație 10^{-3} M, respectiv 10^{-2} M față de proba martor infiltrată cu apă

Suc, ml			Concentrația în proteină mg/100 ml de suc			Cantitatea de proteine în mg găsită în sucul obținut prin stoarcere		
H_2O	DNP	NaN_3	H_2O	DNP	NaN_3	H_2O	DNP	NaN_3
16	35	30	105	177	200	16,8	61,9	60,0
19	34	34	97	181	196	18,4	61,5	66,6
20	36	35	93	174	188	18,6	62,4	65,8
19	37	33	101	172	191	19,1	63,4	62,8
21	33	35	92	189	187	19,2	62,2	65,2
21	31	35	90	200	188	18,8	62,0	65,8
18	35	34	103	181	196	18,5	63,3	66,4
17	32	31	105	193	200	17,8	61,6	62,0
20	31	33	93	195	199	18,5	60,2	65,6
20	33	32	96	192	200	19,1	63,1	64,0

Tabela 4

Cantitatea de suc (ml) și cantitatea de proteine în mg obținută de reziduurile rămase după stoarcerea celor 50 g de frunze proaspete de grîu infiltrate prin vacuum cu apă (proba-martor) și cu soluții de 2,4-dinitrofenol și azidă de sodiu (NaN_3) după prealabila omorîre cu cloroform timp de 24 de ore

Suc, ml			Concentrația în proteină mg/100 ml de suc			Cantitatea de proteine în mg găsită în sucul obținut prin stoarcere		
H_2O	DNP	NaN_3	H_2O	DNP	NaN_3	H_2O	DNP	NaN_3
24	15	17	928	716	684	223	107	116
25	16	18	900	684	656	225	109	118
25	15	19	868	700	608	217	105	116
28	17	20	792	656	592	222	112	118
27	16	18	808	668	648	218	107	117
27	16	17	824	676	664	222	108	113
26	15	19	832	696	616	216	104	117
28	17	18	776	640	624	217	109	112
29	15	18	760	732	640	220	110	115
24	15	17	916	708	664	220	106	113

porumb. Tot din compararea acestor date se constată că, atît în biostructura frunzelor de porumb, cît și în aceea a frunzelor de grîu, cantitatea de proteine este cam de același ordin de mărime.

În schimb însă cantitatea de proteine cuprinsă în sucul frunzelor de porumb o depășește cu mult pe aceea cuprinsă în frunzele de grîu.

CONCLUZII

În frunzele cercetate, cantitatea de proteine integrată în biostructură este mai mare decît cea existentă în lichidul intracelular.

Inhibitorii metabolici determină destrămarea parţială a biostructurii ţesutului foliar, eliberînd o parte din proteinele integrate în ea.

Omorîrea materialului biologic cu cloroform produce o destrămare totală a biostructurii, cu eliberarea proteinelor în cantitate mai mare.

Sucurile din frunzele de porumb conţin substanţe proteice în cantitate mai mare decît cele din frunzele de grîu.

Prezentată la redacţie la 3 august 1970

Universitatea Bucureşti
Facultatea de biologie,
Catedra de biochimie

BIBLIOGRAFIE

1. A. Mihăiescu, St. cerc. biochim., **13**, 301 (1970).
2. E. Macovschi, Biostructura, Edit. Acad. R.S.R. Bucureşti, 1969.
3. A. N. Belozerskii, I. N. Proskuriakov, *Prakticeskoe rukovodstvo po biohimii rastenii*, Gosudarstvennoe izdatelstvo Sovetskaia Nauka Moskva, 1951, p. 293–297.
4. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, J. Farr, L. A. Randall, J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
5. G. L. Miller, Analyt. Chem., **31**, 964 (1959).

THE RELEASE OF PROTEINS FROM THE BIOSTRUCTURE OF SOME LEAVES, UNDER THE ACTION OF METABOLIC INHIBITORS

SUMMARY

The amount of sap and its protein concentration determined after squeezing maize and wheat leaves are higher after treatment as compared to controls.

After killing the biological material, larger amount of sap as well as of proteins can be obtained also from control leaves. This fact demonstrates that metabolic inhibitors produce a partial breakdown of the biostructure, accompanied by the release of water and proteins; by killing, the biostructure of studied leaves breaks down releasing both water and proteins.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 1, 85–91 (1971)

ACTIVITATEA SPECIFICĂ ÎN FUNCȚIE DE pH ȘI COMPORTAREA LA INHIBIȚIA TERMICĂ ȘI CU UREE A MALATDEHIDROGENAZEI DIN CREIER ÎN SERIA VERTEBRATELOR

MIHAIL ȘERBAN

Rezumat. — Se prezintă rezultatele referitoare la activitatea malatdehidrogenazei din creier în funcție de pH la diferite vertebrate, precum și comportarea enzimei la inhibiția termică și cu uree. Malatdehidrogenaza din creier manifestă în cursul evoluției filogenetice un optim de activitate care diferă pe clase de vertebrate. Variațiile în optimul de activitate enzimatică au fost corelate cu caracteristicile pe care le prezintă izoenzimele malatdehidrogenazei din creier la diferite specii de vertebrate.

Malatdehidrogenaza (MDH) este o enzimă care, după originea ei, se prezintă în două forme : citoplasmatică și mitocondrială [1] — [4]. Aceste forme diferă între ele printr-o serie de proprietăți fizico-chimice [5] — [7] și se compun din mai mulți conformeri [8]. Într-o lucrare anterioară [9] am descris caracteristicile pe care le manifestă izoenzimele malatdehidrogenazelor citoplasmatice și mitocondriale din creier în filogenie, precum și comportarea lor la inhibiția cu p. cloromercuribenzoat. Cu această ocazie am stabilit o serie de trăsături distinctive ale acestor izoenzime, trăsături care au fost corelate cu procesul evolutiv.

Date fiind deosebirile care există la diferite vertebrate în polimorfismul celor două forme de izomalatdehidrogenaze din creier, în proprietățile lor electrice, ca și în repartiția activității enzimatice pe diferite tipuri de izoenzime [9], ne-am pus problema dacă și în ce măsură aceste diferențe reprezintă o reflectare a unor particularități ale ansamblului molecular proteic dotat cu activitate MDH. Cu alte cuvinte dacă unele proprietăți generale (ca, de exemplu, activitatea specifică în funcție de pH și comportarea față de anumiți inhibitori) ale aceleiași enzime, provenind însă din surse filetice diferite, se pot corela cu evoluția creierului, respectiv dacă și din acest punct de vedere se pot desprinde anumite trăsături conservative sau adaptări ale sistemului proteic-enzimatic în cursul evoluției vertebratelor.

Acest aspect formează, de fapt, obiectul prezentei lucrări, care constituie o continuare a cercetărilor noastre de biochimie comparată la scară filogenetică.

MATERIAL ŞI METODE

Experienţele au fost întreprinse pe extracte de creier, provenite de la specii reprezentînd toate cele cinci clase de vertebrate : peşti (*Scardinius erythrophtalmus*, *Rutilus rutilus*), amfibii (*Triturus cristatus*, *Rana ridibunda*), reptile (*Emys orbicularis*, *Lacerta viridis*, *Natrix natrix*), păsări (porumbel, raţă), mamifere (şobolan alb, iepure, arici). Modul de prelevare al creierului şi operaţiile efectuate pînă la extracţia proteinelor cerebrale solubile au fost descrise într-o lucrare anterioară [9].

Extracţia malatdehidrogenazelor s-a realizat în apă distilată, cu congelări şi decongelări repetate pentru obţinerea ambelor forme : mitocondrială şi citoplasmatică. Operaţiile de extracţie şi de prelucrare a omogenatelor, precum şi cele de obţinere a extractelor proteice au fost de asemenea descrise anterior [9]. Concentraţia proteinelor cerebrale a variat, în limite restrînse, în jurul valorii de 1 g la 100 ml de extract, în funcţie de provenienţa ţesutului cerebral.

Influenţa pH-ului asupra activităţii enzimatice MDH a fost cercetată la următoarele valori : 7,4 ; 7,8 ; 8,2 ; 8,6. Sistemul de reacţie era compus din 2,7 ml de tampon TRIS-HCl o,2 M cu valorile de pH menţionate, 0.1 ml de oxalacetat 1 mg/ml, 0,1 ml NADH 1 mg/ml, 0,1 ml de enzimă diluată în raportul de 1/100. Soluţiile de substrat şi cofactori au fost făcute în soluţie-tampon TRIS de pH corespunzător fiecăreia dintre cele patru valori menţionate.

Activitatea enzimatică a fost determinată spectrofotometric, urmărind reducerea oxalacetatului la $\lambda = 340$ mμ prin scăderea densităţii optice în intervale de 15 s timp de 1 min [10]. Descreşterea densităţii optice în intervalul 30—45 s după startul reacţiei a fost folosită pentru calcularea activităţii enzimatice. Unităţile enzimatice calculate au fost reportate la 1 mg de proteină, obţinîndu-se astfel activităţile specifice MDH.

Inhibiţia termică s-a realizat prin menţinerea timp de 30 min a soluţiilor proteice, diluate în prealabil în raportul de 1/100, la două nivele de temperatură, şi anume la+55°C şi la+65°C. Această operaţie s-a efectuat într-un ultratermostat Höppler. Ulterior au fost determinate spectrofotometric, în condiţiile menţionate, activităţile enzimatice atît ale probelor supuse inhibiţiei termice, cît şi cele ale probelor normale.

Inhibiţia cu uree s-a realizat la următoarele trei valori de concentraţie : 2, 6 şi 8 M. Soluţia de enzimă ca atare a fost menţinută în contact cu ureea timp de 30 min, raportul dintre această soluţie şi uree fiind astfel ales încît să se realizeze cele trei concentraţii menţionate. Ulterior au fost determinate spectrofotometric activităţile enzimatice ale soluţiilor proteice supuse acţiunii ureei şi aduse la diluţia 1/100.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din analiza datelor obţinute se constată, conform presupunerilor noastre, că activitatea specifică MDH din creier în funcţie de pH prezintă unele caracteristici în cursul evoluţiei filogenetice. Astfel, din figura 1 rezultă că pH-ul corespunzător optimului de activitate enzimatică nu este

același la toate vertebratele; sub acest aspect, speciile de vertebrate cercetate se pot încadra în trei categorii. La vertebratele inferioare (pești, amfibii, reptile) activitatea optimă a enzimei din creier se situează la valori mai mici de pH, și anume 7,4 și 7,8 (*A*, *B*, *C*). O mențiune aparte trebuie făcută la amfibii, la care maximul de activitate enzimatică se extinde pînă la pH = 8,2. Dimpotrivă, la vertebratele superioare, optimul de activitate enzimatică se plasează la valori mai mari de pH. Astfel, la cele două specii de

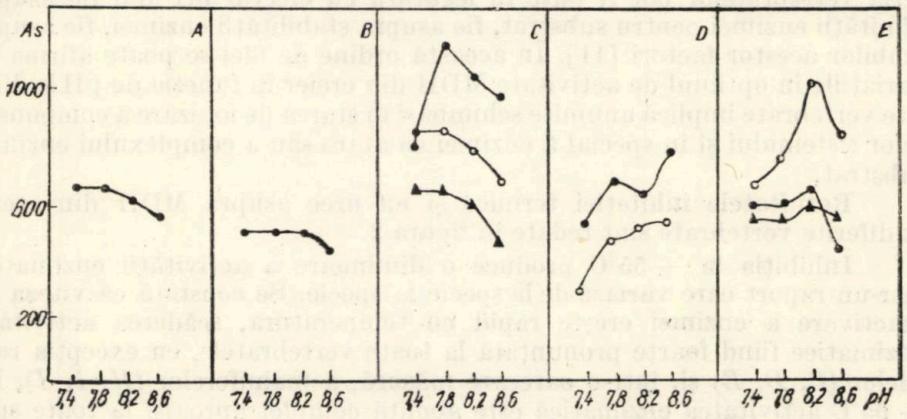


Fig. 1.—Activitatea malatdehidrogenazei din creier în funcție de pH la diferite vertebrate. *A* — pești: *Scardinius erythrophtalmus*, *Rutilus rutilus*; *B*—amfibii: *Rana ridibunda*, *Triturus triturus*; *C* — reptile: *Emys orbicularis* ○———○, *Lacerta viridis* ▲———▲, *Natrix natrix* ●———●; *D*—păsări: porumbel ○———○, rață ●———●; *E* — mamifere: șobolan ●———●, iepure ○———○, arici ▲———▲. As — activitate specifică.

păsări (*D*) acest optim de activitate apare la pH = 8,6. La speciile de mamifere (*E*), maximul de activitate MDH din creier se situează la o valoare de pH între valorile corespunzătoare vertebratelor inferioare și păsărilor, și anume la pH = 8,2. La arici se constată totuși practic aceeași valoare a activității enzimatice atît la pH 8,2, cît și la pH = 8,6.

După cum reiese din figura 1, alura curbelor reprezentînd dependența activității enzimatice MDH de pH este diferită pe clase de vertebrate (*A*, *B*, *C*, *D*, *E*), ceea ce reflectă o anumită corelație între gradul de variație în optimul acestei activități și evoluția creierului pe plan filogenetic.

Comparînd comportarea activității enzimatice MDH din creier în funcție de pH la diferite vertebrate cu caracteristicile celor două forme ale MDH la aceleași specii, se pot face cîteva observații. Astfel, după cum am arătat anterior [9], la speciile de vertebrate inferioare (pești, amfibii și, într-o oarecare măsură, la reptile), forma mitocondrială MDH nu se pune în evidență ca o entitate distinctă, fapt dovedit și prin inhibiție cu p. cloromercuribenzoat. Or, tocmai la aceste specii de vertebrate se constată că maximul de activitate a enzimei se situează la valori mai scăzute de pH. Pe de altă parte, la aceste vertebrate, eterogenitatea formei citoplasmatice a MDH este mai pronunțată, respectiv numărul conformerilor este mai mare decît la vertebratele superioare. Se poate postula deci existența unei corelații între aceste două caracteristici menționate ale izoenzimelor MDH și pH-ul optim de activitate al MDH la vertebratele inferioare. Mai mult încă, la vertebratele superioare, la care pH-ul optim de activitate enzimatică este deplasat spre valori mai mari, s-a pus în evidență, ca o entitate distinctă, forma mitrocondrială a enzimei, formă compusă din mai mulți conformeri.

Nu este exclus astfel ca existenţa, respectiv raporturile cantitative ale celor două forme de MDH din creier la diferite vertebrate să se reflecte în diferenţele de valoare ale pH-ului optim de activitate a enzimei. În acest sens, este plauzibil să se considere aceste diferenţe ca o expresie a rezultantei ansamblului moleculelor de enzimă şi a caracteristicilor acestora, care pot diferi în unele detalii în funcţie de evoluţia filogenetică a creierului. Deosebirile semnalate în optimul de activitate MDH în funcţie de pH în seria vertebratelor pot fi puse în legătură cu efectul pH-ului fie asupra afinităţii enzimei pentru substrat, fie asupra stabilităţii enzimei, fie asupra ambilor acestor factori [11]. În această ordine de idei se poate afirma că variaţiile în optimul de activitate MDH din creier în funcţie de pH la diferite vertebrate implică anumite schimbări în starea de ionizare a componentelor sistemului şi în special a enzimei ca atare sau a complexului enzimă-substrat.

Rezultatele inhibiţiei termice şi cu uree asupra MDH din creier la diferite vertebrate sînt redate în figura 2.

Inhibiţia la + 55°C produce o diminuare a activităţii enzimatice într-un raport care variază de la specie la specie. Se constată că viteza de inactivare a enzimei creşte rapid cu temperatura, scăderea activităţii enzimatice fiind foarte pronunţată la toate vertebratele, cu excepţia reptilelor (*C*, *D*, *E*) şi, într-o oarecare măsură, a mamiferelor (*H*, *I*, *J*). La + 65°C activitatea enzimatică este abolită complet aproape la toate speciile. O excepţie o reprezintă însă păsările (*F*, *G*), la care enzima manifestă o mai mare rezistenţă la denaturarea termică, probabil ca o consecinţă a unei configuraţii structurale deosebite. De fapt, după cum s-a menţionat, la cele două specii de păsări s-a observat că optimul de activitate enzimatică este deplasat spre valori de pH diferite în comparaţie cu celelalte vertebrate cercetate. În acelaşi sens se poate vorbi şi de MDH din creierul de şarpe, la care de asemenea se constată că enzima mai este încă activă după inhibiţie la + 65°C, deşi activitatea enzimatică nu mai constituie decît aproximativ 10% din cea iniţială.

După cum rezultă din figura 2, gradul de inhibiţie a enzimei prin uree este asemănător la toate speciile, procesul fiind reprezentat de acelaşi tip de curbă. Deşi există unele deosebiri în raporturile de inhibiţie ale activităţii la diferite concentraţii de uree în funcţie de activitatea normală la + 37°C, se constată totuşi că ureea, în concentraţia 2M, afectează enzima într-o mai mică măsură decît în treapta de concentraţie 6M. Într-adevăr, între aceste două limite se produce un declin brusc al activităţii enzimatice la toate speciile. Se poate aprecia, totodată, că ureea în concentraţia 6M are, în general, un efect inhibitor mai pronunţat decît inhibiţia termică la + 55°C. La două dintre cele trei specii de mamifere (*I*, *J*), după inhibiţia cu 6M uree, activitatea enzimatică este complet abolită. În fine, la concentraţia 8 M uree, activitatea enzimatică este complet inhibată la toate speciile.

Datele prezentate în această lucrare, coroborate cu cele obţinute anterior, dovedesc atît existenţa unor trăsături caracteristice diferitelor trepte evolutive ca reflectare a discontinuităţii în evoluţie, cît şi a unor trăsături conservative, care reflectă continuitatea pe plan evolutiv. Aceste

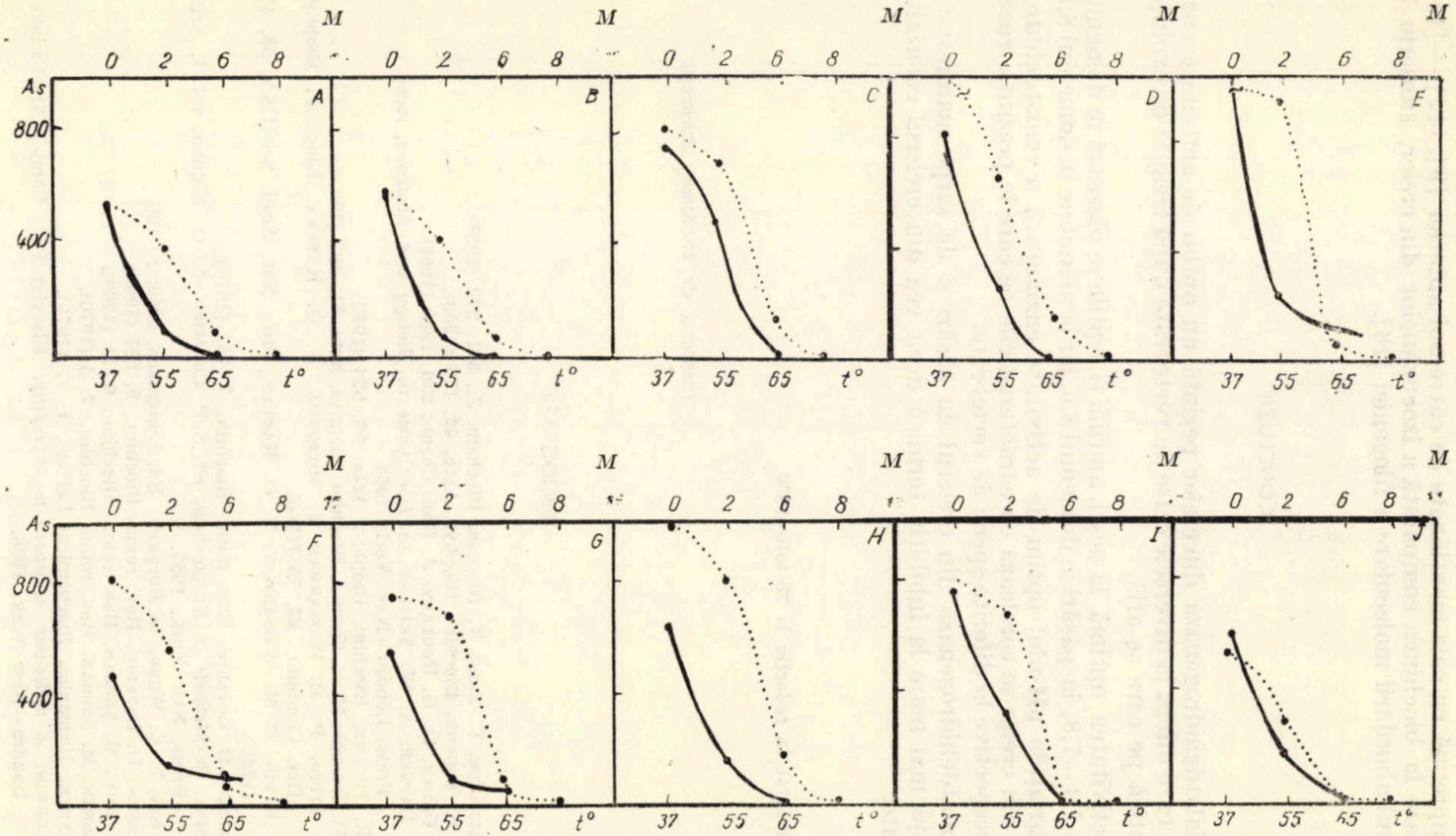


Fig. 2. — Comportarea malatdehidrogenazei din creierul diferitelor vertebrate la inhibiție termică (• —•) și inhibiție cu uree (•···•).
A — Scardinius erythrophtalmus, Rutilus rutilus; B — Rana ridibunda, Triturus triturus; C — Emys orbicularis; D — Lacerta viridis, E — Natrix natrix,
F — porumbel; *G* — rață; *H* — șobolan; *I* — iepure; *J* — arici. As — activitate specifică.

date, împreună cu cele menţionate de către noi anterior [9], [12] — [15], referitoare la biochimia comparată a izoenzimelor din creier, subscriu la conceptul abordării moleculare a filogeniei [16].

CONCLUZII

Malatdehidrogenaza din creier pezintă un optim de activitate enzimatică, care diferă la diversele clase de vertebrate după treapta de evoluţie filogenetică pe care se află.

Activitatea optimă la peşti, amfibii şi reptile se plasează în domeniul de pH = 7,4 — 7,8, la păsări în domeniul 8,6, iar la mamifere în domeniul 8,2.

Variaţiile pH-ului optim de activitate enzimatică a malatdehidrogenazei din creier se corelează cu caracteristicile pe care le prezintă izoenzimele respective la diferite specii de vertebrate.

Malatdehidrogenaza din creierul de păsări şi de şarpe manifestă o rezistenţă mai mare la inhibiţia termică decît cea din creierul celorlalte vertebrate.

Prezentat la redacţie la 20 iulie 1970.

Institutul de biochimie, Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. A. Delbrück, E. Zebe, T. Bucher, Biochem. Z., **331**, 273 (1959).
2. C. J. R. Thorne, Biochim. Biophys. Acta, **42**, 175 (1960).
3. F. C. Grimm, D. G. Doherty, J. Biol. Chem., **236**, 1980 (1961).
4. A. L. Latner, A. W. Skillen, în *Isoenzymes in Biology and Medicine*, Acad. Press, Londra—New York, 1968.
5. C. J. R. Thorne, Biochim. Biophys. Acta, **59**, 624 (1962).
6. C. J. R. Thorne, M. M. Cooper, Biochim. Biophys. Acta, **81**, 397 (1963).
7. G. B. Kitto, P. M. Wassarman, J. Michjeda, N. O. Kaplan, Biochem. Biophys. Res. Commun., **22**, 75 (1966).
8. G. B. Kitto, P. M. Wassarman, N. O. Kaplan, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **56**, 578 (1966).
9. M. Şerban, D. Cotariu, Rev. roum. Biochim., **7**, 157 (1970).
10. S. Ochoa, în *Methods in Enzymology*, ed. S. P. Colowick, N. O. Kaplan, vol. I, Acad. Press, New York, 1957.
11. M. Dixon, E. C. Webb, în *Enzymes*, Ed. Longmans, 1960, p. 120.
12. M. Şerban, D. Cotariu, Rev. roum. Biochim., **5**, 325 (1968).
13. D. Cotariu, M. Şerban, Rev. roum. Biochim., **6**, 11 (1969).
14. M. Şerban, M. Şerban, Rev. roum. Biochim., **7**, 3 (1970).
15. M. Şerban, Rumanian Biochemical Letters, **1**, 37 (1970).
16. M. Florkin, *A molecular approach to phylogeny*, Elsevier Pub. Comp., Amsterdam—Londra—New York, 1966.

THE SPECIFIC ACTIVITY IN TERMS OF pH, AS WELL AS THE BEHAVIOUR WITH RESPECT TO THERMAL AND UREA INHIBITION OF BRAIN MALATE DEHYDROGENASE IN THE SCALE OF VERTEBRATES

SUMMARY

Some findings are presented on brain malate dehydrogenase activity from different vertebrates, in terms of pH, as well as its behaviour with respect to thermal and urea inhibition. Brain malate dehydrogenase displays during phylogenetic evolution an optimum activity which differs in different vertebrate classes. Variations in optimum enzyme activity were correlated with characteristics of brain malate dehydrogenase isoenzymes from various vertebrate species. The behaviour of the enzyme with respect to thermal and urea inhibition is also discussed.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 1, 93–98 (1971)

BIOCHIMIA COMPARATĂ A IZOENZIMELOR. XI. IZOENZIMELE MALATDEHIDROGENAZELOR ŞI LACTATDEHIDROGENAZEI DIN MUŞCHIUL NETED LA UNELE SPECII DE VERTEBRATE[1]

MIHAIL ŞERBAN şi DITA COTARIU

Rezumat. — S-au caracterizat electroforetic izoenzimele malatdehidrogenazei (MDH) şi lactatdehidrogenazei (LDH) din muşchii netezi de diferite vertebrate şi s-au stabilit unele corelaţii între particularităţile acestora şi cele ale izoenzimelor din muşchiul striat în cursul evoluţiei filogenetice a vertebratelor. Rezultatele obţinute indică la aceeaşi specie existenţa unor trăsături comune între cele două tipuri de muşchi.

În lucrări anterioare am caracterizat izoenzimele malatdehidrogenazelor (MDH) citoplasmatice şi mitocondriale [1], precum şi izoenzimele lactatdehidrogenazei (LDH) [2] din muşchii striaţi, stabilind o serie de corelaţii între particularităţile acestor izoenzime în cursul evoluţiei filogenetice a vertebratelor.

Din punctul de vedere al biochimiei comparate, nu au fost, în general, efectuate cercetări comparative asupra izoenzimelor MDH şi LDH din muşchii netezi. Pe de altă parte, deşi muşchii netezi manifestă acelaşi specific funcţional ca şi muşchii striaţi, ei prezintă totuşi unele particularităţi fiziologice, astfel încît investigarea unor forme enzimatice moleculare multiple ar putea reflecta unele aspecte biochimice distinctive la cele două tipuri de muşchi. Totodată, un asemenea studiu extins la ambele tipuri de muşchi şi la specii care ocupă poziţii taxonomice diferite poate contribui la precizarea anumitor raporturi între evoluţia diferitelor izoenzime şi evoluţia filogenetică a vertebratelor.

În lumina acestor considerente, în lucrarea de faţă se abordează comparativ cercetarea izoenzimelor MDH şi LDH din muşchiul neted la unele specii de vertebrate. Menţionăm că investigarea biochimică a muşchiului a fost efectuată de către noi şi sub alte aspecte [3], [4].

MATERIAL ŞI METODE

Determinările au fost efectuate pe muşchi stomacali, ca model de muşchi neted relativ uşor accesibil, provenind de la următoarele specii de vertebrate : amfibii—broască (*Rana ridibunda*), reptile — şarpe (*Natrix*

[1] Asistenţa tehnică: A. Radu.

natrix), şopîrlă (*Lacerta sp.*), păsări — porumbel (*Columba sp.*), raţă (*Anser sp.*), mamifere — şobolan, iepure, arici.

Stomacul, prelevat imediat după sacrificare, a fost curăţat şi spălat în mod repetat cu soluţie fiziologică rece; ulterior s-a îndepărtat cu grijă mucoasa stomacală, fără a leza sau excita ţesutul muscular. Muşchiul neted astfel obţinut a fost tamponat cu hîrtie de filtru şi cîntărit.

Extracţia proteinelor s-a realizat în apă distilată timp de 2 ore la + 4°C, raportul de extracţie fiind de o parte greutate ţesut şi trei părţi extractant. Omogenatul a fost centrifugat 15 min la 800 × g, iar supernatantul obţinut a fost congelat şi decongelat de trei ori. Ulterior s-a procedat la o recentrifugare la 20 000 × g (+ 4°C) timp de 40 min. Concentraţia proteinelor extrase a variat în jur de 1,2 g la 100 ml de extract, în funcţie de provenienţa ţesutului muscular.

Electroforeza extractului proteic pentru punerea în evidenţă a izoenzimelor MDH şi LDH s-a efectuat în gel de amidon (13,8%), obţinut în tampon TRIS-acid citric de pH = 8,5. Migrarea electroforetică s-a făcut în varianta Poulik [5], aplicîndu-se o tensiune de 16 V/cm şi o intensitate de 2 mA/cm timp de 180 min la + 8°C. Cantitatea de proteină aplicată a fost de 150γ. În cazul izoenzimelor MDH, analiza electroforetică s-a efectuat şi la pH = 7,0 în tampon fosfat 8,6 mM — citrat 1,4 mM; în acest caz, condiţiile de migrare au fost: tensiune 10 V/cm, intensitate 3 mA/cm şi timp de migrare 8 ore la + 8°C [1], [6].

Evidenţierea izoenzimelor MDH şi LDH s-a realizat după secţionarea prealabilă a gelului de amidon prin incubare la 37°C timp de 30 min. Mediul de reacţie pentru detectarea MDH a fost constituit dintr-o soluţie-tampon TRIS-HCl 0,1 M, pH = 8,5, conţinînd ca substrat malat de sodiu 2 M şi NBT (ca sare de tetrazoliu), NAD şi fenazinmetosulfat ca acceptori intermediari [7]. În cazul LDH, mediul de reacţie a fost constituit dintr-o soluţie-tampon TRIS-HCl 0,2 M, pH = 7,5, conţinînd ca substrat lactat de sodiu [8], [9].

Activitatea MDH a fost determinată spectrofotometric [10], urmărind oxidarea NADH în prezenţa oxalacetatului la 340 mμ. În acest scop, extractul muscular a fost diluat în prealabil în raportul 1/100, iar activitatea a fost raportată la 1 mg de proteină.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Spectrul electroforetic atît al izoenzimelor MDH, cît şi acela al izoenzimelor LDH din muşchiul neted prezintă, în funcţie de specie, o serie de diferenţieri, care se pot grupa pe clase de vertebrate. Caracteristicile acestor două tipuri de izoenzime, care se încadrează în secvenţe metabolice diferite, interesează gradul lor de polimorfism, mobilitatea electroforetică şi repartiţia activităţii enzimatice pe diferitele fracţiuni.

Astfel, după cum rezultă din figura 1, izoenzimele MDH din muşchiul neted manifestă la mamifere (*a*, *b*, *c*) un polimorfism mai accentuat decît la speciile de vertebrate inferioare (amfibii şi reptile). De asemenea la muşchiul neted de mamifere şi de păsări, se individualizează net două grupe de fracţiuni MDH, distincte după originea lor: cea cu mobilitate electroforetică anodică mai mică corespunde tipului MDH mitocondrial (M), iar cea cu mobilitate mai mare tipului MDH citoplasmatic (C). Diferen-

ţierea naturii celor două forme MDH a fost făcută prin inhibiţie specifică cu p.cloromercuribenzoat, faţă de care forma mitocondrială manifestă o mare sensibilitate. La mamifere, ambele tipuri de MDH din muşchiul neted prezintă mai mulţi conformeri, spre deosebire de păsări, în care caz tipul MDH mitocondrial manifestă o omogenitate mai mare. Fracţiunea mitocondrială MDH se evidenţiază sub forma unei benzi, cu activitate mai redusă însă, şi la cele două specii de reptile (f,g); totodată, se constată că mobilitatea electroforetică a acestei fracţiuni este mai mare decît în cazul mamiferelor şi tinde să facă corp comun cu fracţiunea citoplasmatică MDH.

Anumite diferenţe se constată şi în ceea ce priveşte mobilitatea electroforetică a fracţiunii MDH citoplasmatice. Astfel, la muşchiul neted al speciilor de mamifere, această fracţiune prezintă o mobilitate mai crescută decît în cazul muşchiului neted de reptile şi de amfibie; în schimb, mobilitatea electroforetică a fracţiunii MDH citoplasmatice din muşchiul neted de păsări se situează între cele două extreme menţionate.

Din figura 1 mai reiese şi faptul că activitatea enzimatică este concentrată cu precădere pe fracţiunea MDH citoplasmatică, ceea ce constituie o trăsătură comună pentru muşchiul neted, la toate speciile de vertebrate investigate.

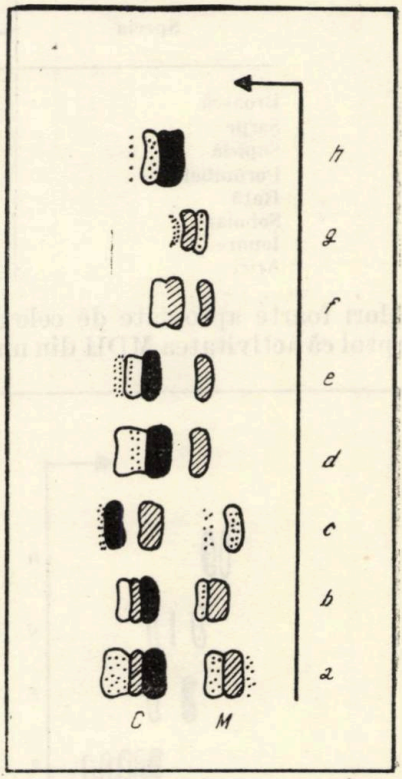


Fig. 1. — Izoenzimele malatdehidrogenazei din muşchiul neted (stomac) la diferite vertebrate — (pH 8,5).
Mamifere: *a* — arici, *b* — iepure, *c* — şobolan; păsări: d — raţă, *e* — porumbel; reptile: *f* — şopîrlă, *g* — şarpe; amfibii: *h* — broască; *M* — forma mitocondrială MDH; *C* — forma citoplasmatică MDH.

Aspectele menţionate referitoare la izoenzimele MDH din muşchiul neted al diferitelor specii reflectă un paralelism destul de pronunţat cu izoenzimele MDH din muşchiul striat al aceloraşi specii [1]. Rezultatele semnalate cu privire la izoenzimele MDH din muşchiul neted întăresc ideia, subliniată în lucrări anterioare [1], [6], că în cadrul aceleiaşi specii caracteristicile acestor izoenzime nu manifestă o specificitate de organ. Într-adevăr, comparînd şi generalizînd datele referitoare la izoenzimele MDH citoplasmatice şi mitocondriale din creier, muşchi striaţi şi muşchi netezi, se constată o serie de trăsături comune fără a exista o specificitate de organ. Dacă această analogie apare evidentă în cadrul unei aceleiaşi specii, există însă diferenţe pe clase de vertebrate, întocmai cum s-a mai menţionat în cazul muşchiului neted.

Activitatea specifică a MDH prezintă valori mai scăzute în muşchiul neted decît în muşchiul striat al aceloraşi specii (tabela 1). La cele două specii de reptile, activităţile specifice ale MDH din muşchiul neted au însă

Tabela 1

Activitatea specifică a malatdehidrogenazei din muşchiul neted şi striat la diferite vertebrate

Specia	uMDH/mg de proteină	
	muşchi neted	muşchi striat
Broască	220± 15	484± 72
Şarpe	413± 17	554± 62
Şopîrlă	507± 59	492± 50
Porumbel	353± 78	716± 65
Raţă	304± 35	817±178
Şobolan	441± 47	855±122
Iepure	424±142	600± 18
Arici	345± 14	1033±125

valori foarte apropiate de cele ale muşchiului striat. Se poate remarca şi faptul că activitatea MDH din muşchiul striat este mai crescută la mamifere şi la păsări decît la celelalte specii; la muşchiul neted însă, activitatea specifică MDH se înscrie pentru toate speciile în jurul aceloraşi valori, poate cu excepţia muşchiului neted de amfibie, unde se întîlnesc valorile cele mai scăzute.

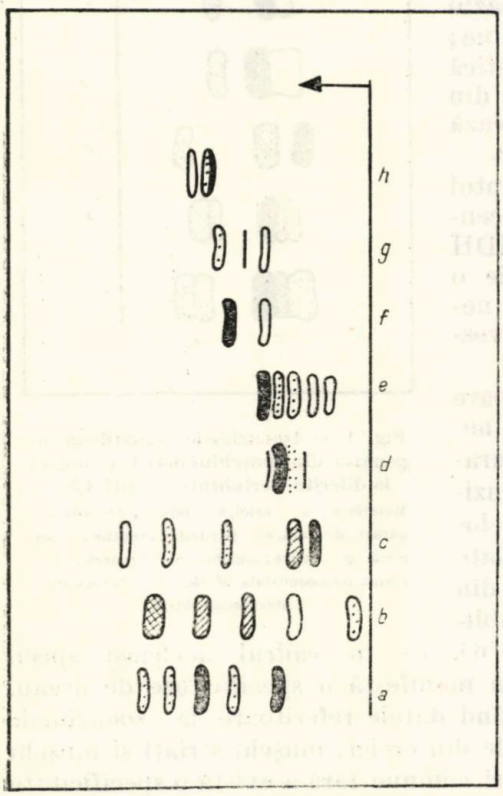


Fig. 2 — Izoenzimele lactatdehidrogenazei din muşchiul neted (stomac) la diferite vertebrate.
Mamifere : *a* — arici, *b* — iepure, *c* — şobolan ; păsări : *d* — raţă, *e* — porumbel ; reptile : *f* — şopîrlă, *g* — şarpe ; amfibii : *h* — broască.

Izoenzimele LDH din muşchiul neted, întocmai ca izoenzimele MDH, prezintă o serie de particularităţi distinctive în seria vertebratelor. Într-adevăr, în figura 2 se constată diferenţe marcate în polimorfismul acestor izoenzime. Astfel, la speciile de mamifere (*a*, *b*, *c*) se pun în evidenţă toate cele cinci tipuri de izoenzime LDH, etalate pe un domeniu extins de mobilitate electroforetică. La muşchiul neted de reptile şi amfibii, gradul de eterogenitate al izoenzimelor LDH este mai puţin accentuat decît la mamifere, evidenţiindu-se doar două tipuri distincte; este posibil ca această caracteristică să fie dependentă de particularităţile de specie ale muşchiului neted, deşi nu poate fi exclusă nici posibilitatea existenţei altor tipuri de izoenzime LDH într-o concentraţie extrem de mică. La

mușchiul neted de păsări, și în special la porumbel, se pun în evidență mai multe tipuri de izoenzime LDH decît la reptile și la amfibii.

Mobilitatea electroforetică a izoenzimelor LDH din mușchiul neted manifestă de asemenea diferențe evidente pe clase de vertebrate. Astfel, mobilitatea tipurilor de izoenzime LDH_1 și LDH_2 este mai mare la mamifere decît la speciile aparținînd celorlalte clase de vertebrate. Este de notat mobilitatea foarte scăzută la mușchiul neted de păsări, unde izoenzimele LDH sînt concentrate într-un bloc mai mult sau mai puțin omogen. Tipurile de izoenzime LDH evidențiate în mușchiul neted la celelalte specii (amfibii și reptile) prezintă mobilități electroforetice mai mari decît la păsări, însă inferioare celor de mamifere.

Pe baza rezultatelor obținute se poate conchide că, deși există deosebiri în funcție de specie, totuși mușchiul neted la diferite vertebrate manifestă o serie de trăsături comune cu mușchiul striat, în ceea ce privește caracteristicile izoenzimelor MDH și LDH.

CONCLUZII

— Izoenzimele malatdehidrogenazelor citoplasmatice și mitocondriale și izoenzimele lactatdehidrogenazei din mușchiul neted prezintă o serie de caracteristici distinctive în funcție de specia și clasa de vertebrate căreia îi aparține.

— Între caracteristicile izoenzimelor malatdehidrogenazelor din mușchiul neted și striat există în cadrul aceleiași specii un paralelism pronunțat.

— Activitatea specifică a malatdehidrogenazelor din mușchiul neted este, în general, mai scăzută decît cea din mușchiul striat la o aceeași specie.

— Deși există unele deosebiri în funcție de specie, totuși caracteristicile izoenzimelor lactatdehidrogenazei din mușchiul neted manifestă o serie de trăsături comune cu acelea din mușchiul striat.

Prezentat la redacție la 13 iulie 1970

Institutul de biochimie, București
Laboratorul de biochimie animală

BIBLIOGRAFIE

1. M. Șerban, D. Cotariu, Rev. roum. biol. Ser. Zool., **3**, 149 (1970).
2. M. Șerban, D. Cotariu, St. cerc. biochim., **12**, 173 (1969).
3. M. Șerban, D. Tănăsescu, St. cerc. biochim., **6**, 559 (1963).
4. M. Șerban, Rev. roum. Biochim., **4**, 211 (1967).
5. M. D. Poulik, Nature, **180**, 1477 (1957).
6. M. Șerban, D. Cotariu, Rev. roum. Biochim., **7**, 157 (1970).
7. C. J. R. Thorne, L. I. Grossman, N. O. Kaplan, Biochim. Biophys. Acta, **73**, 193 (1963).
8. H. J. van der Helm, Lancet, **11**, 108 (1961).
9. E. S. Vessel, I. A. Brody, Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 544 (1964).
10. S. Ochoa, în *Methods in Enzymology*, ed. S. P. Collowick, vol. I, N. O. Kaplan, Acad. Press, N. Y., p. 753.

COMPARATIVE BIOCHEMISTRY OF ISOENZYMES. XI. MALATE DEHYDROGENASE AND LACTATE DEHYDROGENASE ISOENZYMES IN SMOOTH MUSCLES FROM SEVERAL VERTEBRATE SPECIES

SUMMARY

Malate dehydrogenase (MDH) and lactate dehydrogenase (LDH) isoenzymes in smooth muscles of different vertebrates were electrophoretically characterized; some correlations between peculiarities of the latter and those of isoenzymes in skeletal muscles were established, during the phylogenetic evolution of vertebrates. Results indicate in one and the same species the existence of some common features between the two muscle types.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 99–110, 1971

ACȚIUNEA FOSFOLIPIDELOR TOTALE DIN *HELLIANTHUS ANNUUS L.* ASUPRA METABOLISMULUI LIPIDIC LA ȘOBOLANI

J. WINTER, M. SIMIONOVICI, N. BOEȘTEANU, Y. CRISTECU, E. TUCICOV, M. TOCUȘANU, I. A. MOLNAR

Rezumat. — S-a studiat efectul fosfolipidelor din *Helliantlius Annuus* la șobolani supuși unui regim hipoproteic, hiperlipidic și hiperglucidic. Sub influența regimului cresc densitatea optică, lipidele totale, fosfolipidele și colesterolul în plasmă, lipidele totale și colesterolul în ficat, valorile maxime fiind găsite după 4–6 săptămîni. Fosfolipidele și raportul fosfolipide/colesterol în ficat scade la acest interval. La animalele tratate per oral cu fosfolipide totale se observă o puternică protecție față de modificările provocate de regimul hiperlipidic. Efectul protector a avut după 4 săptămîni următoarele valori: în plasmă D.O. 72,8%, lipidemie totală 69,5%, colesterolemie totală 92,3%, fosfolipide 80%, iar în ficat colesterol 45,1%, fosfolipide 262%.

În tratamentul curativ se observă de asemenea efectul protector, avînd însă intensitate mai mică.

Rezultatele obținute susțin întrebuințarea fosfolipidelor totale din *Helliantlius Annuus* în terapia unor tulburări ale metabolismului lipidic și afecțiuni hepatice.

Fosfolipidele au acțiune protectoare în hipercolesterolemia și ateromatoză experimentală, precum și în steatoza experimentală provocată prin regim alimentar steatogen sau prin diferite intoxicații [1]–[15]. Majoritatea autorilor au folosit în experiențele lor diferite fosfolipide naturale, care nu au fost bine individualizate chimic, fiind amestecuri de fosfolipide și de lipide complexe în proporții variate, în funcție de origine și modul de preparare.

S-au folosit astfel lecitine de origine animală, fracțiuni solubile în alcool din lecitinele din soia, denumite E.P.L., fracțiuni insolubile, care s-au dovedit active atît asupra fracțiunilor lipidice din plasmă, cît și asupra lipidelor hepatice.

Într-o serie de lucrări s-au comparat efectele fosfolipidelor avînd diferite grade de saturație a acizilor grași.

Edgren [14] a studiat comparativ acțiunea fosfolipidelor nesaturate și hidrogenate din soia asupra activității de clarifiere a serului pe emulsie artificială de lipide, dovedind că sub influența lor se eliberează factorul de clarifiere în ser, proprietate pe care o posedă heparina și sulfomucopolizaharidele. La animalele tratate cu fosfolipide din soia, activitatea de clarifiere a serului crește, iar la cele tratate cu fosfolipide hidrogenate efectul

este aproape nul. Aceste rezultate arată că activitatea farmacologică a lecitinelor depinde de gradul lor de nesaturare.

Maurakas şi colab. [15] au studiat acţiunea unei fosfolipide sintetice saturate D,α-(dihexanoil)fosfatidiletanolamina la iepuri, avînd regim alimentar bogat în colesterol şi ulei de bumbac. Compusul studiat nu are nici un efect asupra colesterolemiei, lipidemiei plasmatice şi extinderii plăcilor ateromatoase, însă sub influenţa lui colesterolul din ficat scade.

Adams şi colab. [16] au arătat că lecitina din ou cu acizi graşi mai saturaţi protejează degenerescenţa grasă a ficatului, însă nu protejează formarea ateromului, pe cînd EPL, bogat în acizi graşi polinesaturaţi, protejează atît degenerescenţa grasă a ficatului cît şi dezvoltarea ateromului.

Ei atribuie acţiunea hepatoprotectoare grupărilor fosforil şi colină şi activitatea antiaterogenică acizilor graşi nesaturaţi din lecitină.

Din aceste date rezultă că nu există un paralelism între acţiunea hipocolesterolemiantă şi cea hepatoprotectoare, efectul farmacologic depinzînd de compoziţia şi de gradul de saturare a fosfolipidelor cercetate.

Scopul lucrării de faţă îl constituie studierea acţivităţii fosfolipidelor totale din seminţe de floarea-soarelui (a căror compoziţie chimică a fost studiată) în hipercolosterolemia experimentală şi degenerescenţa grasă a ficatului.

MATERIAL ŞI METODE

În experienţele noastre am folosit şobolani de rasă Wistar, masculi în greutate de 200 — 250 g supuşi la un regim hipoprotidic, hiperlipidic şi hiperglucidic (la regimul de experienţă, alcătuit din făină de grîu 42%, făină de orz 42%, făină de porumb 8%, lapte praf 6%, praf de carne şi oase 1,85%, clorură de sodiu 0,15%, s-a adăugat la fiecare sută de grame : colesterol 2 g, metil-tiouracil 0,2 g, untură de porc 3 g, glucoză 20 g, oleat de sodiu 0,2 g, vitamina D_2 140 00 de unităţi şi apă *ad libitum*), avînd final un conţinut de 8,5% proteine şi 20% lipide.

Modificările lipidelor plasmatice şi hepatice s-au urmărit iniţial la 4 loturi de 7 şobolani, care au primit numai regimul de bază, în comparaţie cu 4 loturi de şobolani, care au primit regimul hiperlipidic, animalele fiind sacrificate la 2, 4, 6 şi 8 săptămîni.

S-a prelevat sîngele din aorta abdominală pe citrat de sodiu şi s-a determinat în plasmă colesterolul total după Liebermann-Burchard, lipidele totale după Bianchini [20], densitate optică la 610 mμ şi fosfolipidele. În ficatul uscat s-au determinat lipidele totale prin extracţie cu dicloretan, după metoda Leytes [18], colesterolul total, fosfolipidele după metoda lui Berenblum şi Chain [19] (p. lipidic × 2,5 = fosfolipide) şi lipidele neutre prin diferenţă.

Rezultatele au fost exprimate procentual în ficatul sicc. şi procentual în lipidele totale.

Pentru studiul acţiunii fosfolipidelor din seminţele de floarea-soarelui s-au folosit 4 serii de experienţe. La fiecare serie s-au folosit cîte 3 loturi [illegible] 7 animale, primul lot primind regimul de bază, al doilea lot regimul [illegible]pidic, iar al treilea lot primind regimul hiperlipidic + un tratament

zilnic per oral, cu 0,5 ml dintr-o emulsie apoasă de fosfolipide de 16% corespunzătoare la 80 mg fosfolipide /100 g de corp.

În seria I-a și a II-a tratamentul a fost administrat simultan cu regimul timp de două săptămîni (seria I) și, respectiv, 4 săptămîni (seria a II-a). În seriile a III-a și a IV-a s-au studiat acțiunea preventivă și curativă a fosfolipidelor totale. Astfel, în seria a III-a lotul-martor a primit regim hiperlipidic timp de două săptămîni, urmat de regimul de bază timp de patru săptămîni. Lotul tratat cu fosfolipide a primit același regim alimentar ca și martorul, fosfolipidele administrîndu-se pe toată durata experimentării. În seria a IV-a lotul-martor a primit regim hiperlipidic timp de 4 săptămîni, urmat de regim de bază patru săptămîni, iar cel tratat a primit în plus fosfolipide pe toată durata experimentării.

În fiecare serie s-a folosit în paralel și un lot-martor, care pe toată durata experimentării a primit numai regimul de bază.

După terminarea perioadei respective, animalele au fost sacrificate și s-au efectuat determinările analitice amintite. Determinările de D.O., lipidemie totală și colesterolemie în plasmă s-au efectuat individual, iar rezultatele s-au interpretat statistic. Fosfolipidele plasmatice și determinările analitice în ficat s-au efectuat pe loturi.

Efectul obținut la lotul tratat a fost exprimat în diferențe procentuale față de lotul care a primit regim hiperlipidic și în efectul protector, calculat după formula

$$E_{p\%} = 100 - \frac{T - C}{I - C} \times 100,$$

în care E_p este efectul procentual, T valoarea medie obținută la animalele tratate cu fosfolipide, C valoarea medie obținută la animalele martor netratate și I valoarea medie obținută la animalele care au primit regim hiperlipidic.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Datele privind analiza plasmei, în funcție de durata regimului hiperlipidic, sînt trecute în tabela 1, iar cele privind lipidele hepatice în tabelele 2 și 3. În aceste tabele, valorile lotului-martor, cu regim alimentar de bază, reprezintă media valorilor în cele 4 serii de determinări.

Din aceste date rezultă că, în urma administrării regimului hiperlipidic, în primele 4 săptămîni se observă o creștere atît a lipidemiei totale, cît și a colesterolului și fosfolipidelor sanguine. De asemenea densitatea optică crește. După 6 săptămîni, colesterolul și fosfolipidele plasmatice mai cresc puțin, dar lipemia totală și densitatea optică scad. După 8 săptămîni toate valorile au fost sub cele maxime atinse. Se pare că după un timp prelungit ar exista o acomodare a organismului față de regimul hiperlipidic administrat. Se poate considera din aceste date că modificările cele mai intense ale lipidelor plasmatice se observă după 4 săptămîni, iar după 6 săptămîni există o tendință de revenire spre normal.

Tabela 1

Modificarea lipidelor plasmatice sub influența regimului hiperlipidic

Lot	Nr. de animale	Tratament	D.O.		Lipidemie totală		Colesterol total		Fosfolipide	
				Efect %	mg/100 ml	Efect %	mg/100 ml	Efect %	mg/100 ml	Efect %
1	28	Regim alim. de bază	0,056 ±0,005	— —	611 ±38,4	— —	167 ±14,7	— —	33,6 —	— —
2	7	Regim hiperlipidic 2 săptămîni	0,366 ±0,120	+553	1595 ±231	+161 —	242 ±48,6	+ 45	—	—
3	7	Regim hiperlipidic 4 săptămîni	0,595 ±0,129	+907	1525 ±146	+149	319 ±26,5	+ 91	117,5 —	+249
4	7	Regim hiperlipidic 6 săptămîni	0,061 ±0,07	—	671 ±46	+9,8	372 ±72,5	+122	128,0	+280
5	7	Regim hiperlipidic 8 săptămîni	0,184 ±0,045	+228	707 ±46,5	+15,8	273 ±71,3	+ 63	111,2	+233

Tabela 2

Modificarea lipidelor hepatice sub influența regimului hiperlipidic

Lot	Nr. de animale	Tratament	Lipide totale		Colesterol		Fosfolipide		Lipide neutre	
			% în ficat sicc.	Efect %	% în ficat sicc.	Efect %	% în ficat sicc.	Efect %	% în ficat sicc.	Efect %
1	28	Regim alim. de bază	15,27	—	1,08	—	2,09	—	12,10	—
2	7	Regim hiperlipidic 2 săptămîni	23,9	+ 56	7,80	+622	1,49	−23,9	14,61	+20
3	7	Regim hiperlipidic 4 săptămîni	36,5	+139	12,29	+1038	0,275	−86,8	23,93	+ 97
4	7	Regim hiperlipidic 6 săptămîni	46,2	+202	18,41	+1604	0,37	−82,3	27,42	+126
5	7	Regim hiperlipidic 8 săptămîni	53,1	+248	25,48	+2259	1,19	−43,0	26,50	+119

Tabela 3

Modificări în compoziția lipidelor hepatice sub influența regimului hiperlipidic

Lot	Nr. de animale	Tratament	Colesterol		Fosfolipide %		Lipide neutre		Raport fosfolipide/ colesterol	
			%	Efect %	%	Efect %	%	Efect %	%	Efect %
1	28	Regim alim. de bază	7,14	—	13,75	—	79,11	—	1,93	—
2	7	Regim hiperlipidic 2 săptămîni	32,63	+357	6,23	−54,8	61,20	−22,6	0,19	−90,1
3	7	Regim hiperlipidic 4 săptămîni	33,67	+371	0,75	−94,5	65,58	−17,1	0,022	−98,8
4	7	Regim hiperlipidic 6 săptămîni	39,93	+459	0,80	−94,2	59,29	−25,1	0,020	−99,0
5	7	Regim hiperlipidic 8 săptămîni	47,92	+571	2,24	−83,8	49,48	−37,4	0,047	−97,5

În ficat se observă creșterea conținutului în lipide totale, colesterol și lipide neutre, însoțită de reducerea conținutului de fosfolipide.

Apare însemnată depunerea de colesterol, care, raportat la ficatul uscat, a atins după 8 săptămîni de regim hiperlipidic de 23 de ori valoarea inițială. Lipidele neutre cresc de circa 2 ori, iar lipidele totale de 3,5 față de valoarea inițială. Conținutul minim în fosfolipide este atins după 4 săptămîni, cînd ajunge la a 8-a parte din valoarea inițială. Analizînd compoziția lipidelor hepatice, modificările cele mai importante sînt caracterizate prin creșterea masivă a conținutului în colesterol, însoțite de scăderea importantă a fosfolipidelor, fenomen reprezentat cel mai bine prin raportul fosfolipide/colesterol, care după 8 săptămîni ajunge de la valoarea inițială de 1,93 la 0,047. Este interesant de semnalat faptul că, deși lipidele neutre în ficatul sicc. cresc, proporția lor în lipide scade.

Se poate înregistra o corelație între fosfolipidele plasmatice și cele hepatice. În primele 6 săptămîni se observă scăderea fosfolipidelor hepatice și creșterea celor plasmatice, după 8 săptămîni apare o tendință de revenire spre normal a fosfolipidelor plasmatice, însoțită de o ușoară creștere a lor în ficat.

Luînd în considerație ansamblul fenomenelor observate în ficat și plasmă în urma administrării regimului hiperlipidic, a rezultat că pentru testarea acțiunii fosfolipidelor durata administrării regimului nu trebuia să depășească patru săptămîni, modificările hepatice și plasmatice fiind maxime în acest moment, după care o parte din modificările lipidelor plasmatice au tendința de revenire spre normal.

Sub influența tratamentului concomitent cu fosfolipide timp de 2 sau 4 săptămîni (tabelele 4 și 5), se observă scăderea însemnată a densității optice, a lipidemiei totale colesterolemiei totale și a fosfolipidelor din plasmă față de lotul tratat numai cu regim hiperlipidic.

Acțiunea protectoare a fosfolipidelor față de modificările provocate de regimul hiperlipidic este evidentă și semnificativă.

Tabela 4

Modificările lipidelor plasmatice sub influența tratamentului cu fosfolipide concomitent cu regim hiperlipidic

Seria I 2 săptămîni

Lot	Tratament	D.O.	Lipidemie totală mg/100 ml	Colesterol total mg/100 ml
1	Regim alimentar de bază	0,046 ±0,007	7,07 ±67	99,7 ±23,5
2	Regim hiperlipidic	0,366 ±120	1595 ±231	242,1 ±48,6
3	Regim hiperlipidic și fosfolipide totale	0,185 ±0,046	1122 ±91	172,4 ±19,3
	Efect %	−48,6	−29,5	28,8
	Efect protector %	56,5	52,8	49,9

Tabela 5

Modificările lipidelor plasmatice sub influenţa tratamentului cu fosfolipide concomitent cu regim hiperlipidic

Seria a II-a 4 săptămîni

Lot	Tratament	D.O.	Lipidemie totală mg/100 ml	Colesterol total mg/100 ml	Fosfolipide mg/ 100 ml
1	Regim alimentar de bază	0,062 ±0,002	682 ±43	198,7 ±28,7	17,5
2	Regim hiperlipidic	0,595 ±0,129	1525 ±146	319,1 ±26,5	117,5
3	Regim hiperlipidic şi fosfolipide	0,207 ±0,040	946 ±107	217,2 ±23,2	37,5
	Efect %	−65,2	−38,0	−32,8	−68,0
	Efector protector %	72,8	69,5	92,3	80,0

În ceea ce priveşte modificările lipidelor, în experienţa de 2 săptămîni conţinutul în lipide totale nu a fost influenţat, în schimb colesterolul scade şi fosfolipidele cresc, de asemenea raportul fosfolipide / colesterol creşte în cele două serii de experienţe.

Sub influenţa administrării fosfolipidelor, concomitent cu regim hiperlipidic, conţinutul în colesterol şi fosfolipide al ficatului şi proporţia lor în lipide revin spre valorile normale.

Efectul fosfolipidelor din floarea-soarelui a fost evident şi în experienţele de tip curativ (seria a III-a şi a IV-a). În seria de experienţe de două săptămîni de regim hiperlipidic şi patru săptămîni de convalescenţă, valorile densităţii optice, ale colesterolului şi ale fosfolipidelor în plasmă au revenit la normal, de asemenea au revenit la normal atît conţinutul, cît şi proporţia lipidelor hepatice (tabelele 6 — 9).

Tabela 6

Modificarea lipidelor în ficatul sicc sub influenţa tratamentului cu fosfolipide concomitent cu regim hiperlipidic

Seria I 2 săptămîni

Lot	Tratament	Lipide totale %	Colesterol %	Fosfolipide %	Lipide neutre
1	Regim alim. de bază	14,8	0,98	2,37	11,55
2	Regim hiperlipidic	23,9	7,80	1,49	14,61
3	Regim hiperlipidic + + fosfolipide	22,7	4,72	3,80	14,18
	Efect %	−5,0	−39,4	+155,0	−2,9
	Efect protector %	13,1	−45,1	262	—

Tabela 7

Modificările lipidelor în ficatul sicc sub influența tratamentului cu fosfolipide concomitent cu regim hiperlipidic Seria a II-a 4 săptămîni

Lot	Tratament	Lipide totale %	Colesterol %	Fosfolipide %	Lipide neutre %
1	Regim. alim. de bază	13,7	1,04	1,33	11,33
2	Regim hiperlipidic	36,5	12,29	0,275	23,93
3	Regim hiperlipidic + + fosfolipide	36,8	12,68	1,10	23,02
	Efect %	+0,8	+3,3	+300	−3,9
	Efect protector %	—	—	77,5	—

Tabela 8

Modificări în compoziția lipidelor hepatice sub influența tratamentului cu fosfolipide concomitent cu regim hiperlipidic Seria I 2 săptămîni

Lot	Tratament	Colesterol %	Fosfolipide %	Lipide neutre %	Raport fosfolipide/ colesterol
1	Regim alim. de bază	6,49	16,34	77,17	2,51
2	Regim hiperlipidic	32,63	6,23	61,20	0,19
3	Regim hiperlipidic + + fosfolipide	20,79	16,74	63,47	0,80
	Efect %	−36,3	+168,7	+3,7	+321
	Efect protector	−45,3	103,9	—	26,3

Tabela 9

Modificări în compoziția lipidelor hepatice sub influența tratamentului cu fosfolipide concomitent cu regim hiperlipidic Seria a II-a 4 săptămîni

Lot	Tratament	Colesterol %	Fosfolipide %	Lipide neutre %	Raport fosfolipide/ colesterol
1	Regim alim. de bază	8,27	97,2	82,01	1,17
2	Regim hiperlipidic	33,67	0,75	65,58	0,022
3	Regim hiperlipidic + + fosfolipide	34,45	2,98	62,57	0,086
	Efect %	+2,3	+297	−4,5	+291
	Efect protector	—	24,8	—	5,6

La lotul care a primit numai regim hiperlipidic, colesterolul plasmatic nu a revenit la normal.

Reiese deci că în aceste experienţe hipercolesterolemia a fost în întregime protejată de fosfolipide. În ficat, sub influenţa tratamentului, creşte procentul de fosfolipide, proporţia lor depăşind chiar valorile găsite la animalele martor (cu regim de bază).

În experienţa cu 4 săptămîni de regim hiperlipidic şi 4 săptămîni de convalescenţă (tabela 10), valorile densităţii optice şi ale lipidemiei totale nu au revenit la normal. Sub influenţa tratamentului se observă efectul protector al fosfolipidelor (tabelele 11 şi 12), manifestat prin acumularea fosfolipidelor şi creşterea raportului fosfolipide/colesterol în ficat.

Cunoscînd importanţa fosfolipidelor pentru funcţia membranei celulară, administrarea fosfolipidelor care determină o mărire a permeabilităţii permite îmbunătăţirea funcţiilor celulei hepatice alterate prin degenerescenţa grasă.

Tabela 10

Modificările lipidelor plasmatice sub influenţa tratamentului curativ cu fosfolipide Seria a IV-a

Lot	Tratament	D.O.	Lipidemie totală mg/100 ml	Colesterol total mg/100ml	Fosfolipide mg/100 ml
1	Regim alimentar de bază 8 săptămîni	0,080 ±0,010	631 ±13,3	82,8 ±8,2	55,0
2	Regim hiperlipidic Regim de bază 4 săptămîni	0,184 ±0,045	887 ±51,5	109,9 ±7,1	66,7
3	Regim hiperlipidic + fosfatide 4 săptămîni Regim de bază fosfolipide 4 săptămîni	0,093 ±0,012	707 ±46,5	144,0 ±14,8	73,7
	Efect %	−49,4	−20,3	—	—
	Efect protector %	87,5	70,3	—	—

Tabela 11

Modificările lipidelor în ficat sicc. sub influenţa tratamentului curativ cu fosfolipide Seria a IV-a

Lot	Tratament	Lipide totale %	Colesterol %	Fosfolipide %	Lipide neutre %
1	Regim alim. de bază 8 săptămîni	19,18	1,13	3,05	11,33
2	Regim hiperli idic 4 săpt., regim de bază 4 săpt.	14,65	1,85	1,92	23,93
3	Regim hiperlipidic + fosfolipide 4 săpt., regim de bază + fosfolipide 4 săptămîni	16,81	2,05	3,02	23,02
	Efect %	+14,8	+10,8	+69,3	−3,6
	Efect protector %	—	—	97,3	

Tabela 12

Modificările compoziției lipidelor hepatice sub influența tratamentului curativ cu fosfolipide
Seria a IV-a

Lot	Tratament	Colesterol %	Fosfolipide %	Lipide neutre %	Raport fosfolipide /lipide
1	Regim. alim. de bază 8 săptămîni	5,89	15,90	78,21	2,70
2	Regim hiperlipidic 4 săptămîni, regim de bază 4 săptămîni	12,63	13,10	74,27	1,04
3	Regim hiperlipidic + fosfolipide 4 săptămîni, regim de bază + fosfolipide 4 săptămîni	12,19	17,91	69,90	1,47
	Efect %	— 4,3	+36, 7	— 7,1	+41,3
	Efect protector %	—	238	—	34,9

CONCLUZII

Sub influența regimului hiperlipidic, valorile densității optice ale lipidemei totale, colesterolului și fosfolipidemei plasmatice cresc, de asemenea crește conținutul în lipide totale și colesterol hepatic, în timp ce conținutul în fosfolipide și raportul fosfolipide/colesterol scad. Intensitatea maximă a tuturor fenomenelor este maximă la 4 săptămîni.

Sub influența tratamentului pe cale per orală cu fosfolipide totale din semințe *Hellianthus Annuus* în doze de 80 mg/100 g corp, se obține o scădere a hiperlipidemiei, hipercolesterolemiei, hiperfosfolipidemiei și a densității optice a plasmei, precum și scăderea lipidelor totale și a colesterolului în ficat, însoțită de o creștere a fosfolipidelor și a raportului fosfolipide/colesterol.

Fosfolipidele administrate au un efect protector însemnat față de regimul hiperlipidic. Această proprietate poate justifica folosirea fosfolipidelor din floarea-soarelui în tratamentul unor tulburări ale metabolismului lipidic, ca hipercolesterolemie, hiperlipidemie și unele afecțiuni hepatice.

Prezentată la redacție la 26 iunie 1970.

Institutul de cercetări chimico-farmaceutice, București

BIBLIOGRAFIE

1. H. D. Kesten, R. Siebowithz, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **49**, 71 (1952).
2. M. Friedman, Am. J. Clin. Nutrition, **8**, 318 (1960).
3. M. Friedman, S. O. Byers, R. H. Rosenman, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **95**, 586 (1957).

4. S. O. Byers, M. Friedman, J. Lipid Res., **1**, 343 (1960).
5. I. Rohrschneider, Med. Klin., **53**, 782 (1958).
6. S. Dornbusch, A. Zielke, Med. Welt, 1685 (1960).
7. E. Van Handel, J. Nutr. **73**, 259 (1961).
8. F. J. Bowman, G. Downs, R. L. Sabutt , Trans. Kentucky Acad. Sci., **24**, 12 (1963).
9. G. Pellegrini, Boll Ital. Biol. Sper., **39**, 1440 (1963).
10. N. F. Mac Lagan, C. Howell, J. D. Billimoria, J. Lipid Res, **7**, 242 (1966).
11. J. D. Billimoria, C. Howell, N. F. Mac Lagan, Biochem, J., **96**, 5 (1965).
12. F. Hartman, R. G. Hess, Deutsch Z. Verdaung u Stoffwechsel krankh, **18**, 155 (1958).
13. T. Kobayashi, Yokugaku Zasshi, **80**, 1606, (1960).
14. B. Edgren Acta Pharmacol Toxicol., **16**, 270 (1960).
15. J. Maurakas, J. B. Pidmer, C. V. Holland, Atherosclerosis Res., **6**, 389 (1966).
16. C. W. M. Adams, O. B. Bayliss, M. Z. M. Ibrahim, M. W. Webster, J. Pathol. Bacteriol., **86**, 431 (1963).
17. C. W. M. Adams, R. S. Morgan, J. Pathol. Bacteriol., **94**, 73 (1967).
18. K. M. Leytes, F. K. Yakusheva, Probl. Endocrinol i Gormonoterapie, **1**, 85 (1955).
19. I. Berenblum, E. Chain, Biochem. J., **32**, 295 (1938).
20. P. Bianchini, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., **34**, 685 (1958).

THE INFLUENCE OF TOTAL PHOSPHOLIPIDS FROM HELLIANTHUS ANNUUS ON THE LIPID METABOLISM IN RATS

SUMMARY

The effect of phospholipids from Hellianthus Annuus was studied in rats subjected to a hypoproteic, hyperlipidic and hyperglucidic diet.

Under the influence of the diet, the optical density, total lipids, phospholipids, plasmatic cholesterol, as well as liver total lipids and cholesterol increase, the highest values occurring after 4 — 6 weeks.

Both phospholipids and phospholipid/cholesterol ratio in liver decrease during this interval.

In p.o. treated animals with total phospholipids a strong protection against the alterations brought about by the hyperlipidic diet was observed.

The protective effect had after 4 weeks the following values : in plasma OD 72.8%, total lipidaemia 69.5%, total cholesterolemia 92.3%, phospholipids 80% and in liver cholesterol 45.1%, phospholipids 262%.

A protective effect of lower intensity could be also noted during curative treatment.

These findings indicate that total phospholipids from Hellianthus Annuus could be used in the therapy of some disorders of lipid metabolism or in some liver diseases.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 1, 111–117 (1971)

J. SZYMENDERA, *Bone mineral metabolism in cancer, Recent Results in Cancer Research* (*Metabolismul mineral osos în cancer, rezultate recente ale cercetărilor asupra cancerului*), Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 1970, 110 p.

În lucrarea de față, împărțită în cinci capitole, autorul prezintă unele probleme ale metabolismului țesutului osos și ale patogeniei diferitelor sale tumori.

Ținînd seama de noile metode pentru studierea stării plasmei, filtrării renale și cineticii calciului și fosfatului anorganic, autorul dă informații valoroase cu privire la metabolismul osos în osteoporosis hipo- și hiperparatiroidism și în alte boli ale țesutului osos.

Capitolele I și II se ocupă de folosirea noilor tehnici în studiul cîtorva probleme, rămase încă deschise, ale metabolismului mineral osos la pacienții cu cancer.

Capitolul III tratează amănunțit tehnicile recente folosite în studiul metabolismului mineral osos.

Capitolul IV studiază problemele metabolismului mineral în tumoarea malignă fără o distrugere vizibilă a osului. Autorul menționează că, la majoritatea pacienților cu leziuni osoase secundare, starea plasmei, filtrarea renală și cinetica calciului și fosfatului sînt normale, deși variabilitatea fiecărui parametru a fost mai mare decît la subiectele normale.

Capitolul V tratează probleme ale metabolismului mineral în tumoarea malignă cu leziuni osoase. Se arată că, la pacienții cu plasmacitom, starea plasmei, filtrarea renală și cinetica calciului și fosfatului reflectă numai procese osteolitice și de refacere.

Lucrarea, bazată pe o documentare bogată (255 de referiri), numeroase figuri, grafice, scheme și tabele, precum și un indice de subiecte, este valoroasă și utilă specialiștilor.

Irina Cornoiu

Institutul de biochimie, București

D. S. GREEN și H. BAUM, *Energy and the mitochondrion* (*Energia și mitocondria*), Academic Press, New York-Londra, 1970, 205 p.

Lucrarea reprezintă o introducere în problema modalităților de transformare a energiei în membranele sistemelor vii. Sistemul mitocondrial este prezentat ca o unitate operațională și transformatoare și este folosit ca model pentru toate sistemele prevăzute cu membrane pe baza unei interpretări originale, logice și integrate a acestora. O altă trăsătură a originalității o constituie modul netradițional de tratare a subiectului, acesta fiind abordat sub aspect ultrastructural și molecular. Legarea organică a funcțiunii de ultrastructură este fundamentul folosit nu numai pentru explorarea sistemului enzimatic, ci și pentru discutarea mecanismelor principalelor procese biochimice, pe baza modelului molecular al membranelor care adăpostesc aceste sisteme enzimatice.

După o introducere asupra „mașinilor biologice" de transformare a energiei, se prezintă sistemele enzimatice și interrelațiile lor. Urmează descrierea compoziției și a ultrastructurii membranelor și apoi a mitocondriei. În continuare se discută cuplarea procesului de transfer electronic cu generarea stării de energizare. Se insistă apoi asupra modificărilor conformaționale ale unităților morfologice ale membranelor, care, în consecință, își modifică configurația. Mecanismele moleculare ale proceselor de energizare și dezenergizare constituie una dintre părțile cele mai originale. Cartea se încheie cu descrierea altor sisteme de transformare a energiei, care urmează a fi explicate pe baza acelorași mecanisme moleculare.

Largul cerc de specialiști cărora li se adresează, deosebita actualitate a temei, originalitatea și claritatea expunerii recomandă acest volum ca un deosebit succes editorial.

V. Eșanu

Institutul de cercetări pentru protecția plantelor.
București

The International Journal of Biochemistry (*Jurnalul Internațional de biochimie*), ed. prof. G. A. KERKUT, Scientechnica (Publishers), Ltd, 823—825 Bath. Road, Bristol, England BS 4 5NU

Pe tărîmul publicațiilor biochimice și-a făcut apariția,începînd din februarie 1970, o nouă revistă de specialitate, „Jurnalul internațional de biochimie", care se anunță a fi bilunară și va publica articole cu rezultate ale cercetărilor originale în următoarele domenii: biochimia teoretică, biochimia animală, a plantelor, a fungilor, a bacteriilor, biochimia clinică și aplicată. Se vor îngloba de asemenea în această revistă articole și diferite referate, precum și scurte comunicări.

Primul număr al acestei publicații (128 p.) cuprinde 16 lucrări din diverse ramuri ale biochimiei, semnate de biochimiști de prestigiu. Sînt relatate probleme axate pe studiul mitocondriilor la diferite animale, al hemoglobinei de păstrăv, al enzimelor (ca lactat și malatdehidrogenazele, esterazele, proteinazele alcaline, dezoxiribonucleazele), alături de caracterizarea antigenelor termostabile din serul de păsări și din cel de mamifere.

Prin valoarea lucrărilor publicate, prin gama largă de aspecte abordate și prin ținuta grafică corespunzătoare, se pare că revista de față va fi un instrument prețios la îndemîna biochimiștilor dornici să-și îmbogățească cultura de specialitate.

Ioana Hagima-Călin

Institutul de biochimie, București

Progress in molecular and subcellular biology (*Progrese în biologia moleculară și subcelulară*). vol. I, ed. F. E. HAHN, Edit. Springer, Berlin-Heidelberg- New York, 1969, 237 p.

Această lucrare pune la îndemîna cercetătorilor o sinteză a cunoștințelor actuale în unele domenii ale biologiei moleculare. Ea cuprinde 5 capitole.

În capitolul I, intitulat „Semnificația biologică a codului genetic", C. R. Woese trece în revistă, în lumina ultimelor descoperiri, principalele caracteristici ale codului genetic, mecanismele sintezei proteice și problemele privind universalitatea codului genetic.

În capitolul II, „Erori de traducere", J. Davies analizează factorii care împiedică transmiterea corectă a mesajului genetic de la ADN la ribozomi.

În capitolul III, „Încorporarea florouracilului în ARN și consecințele ei moleculare", H. G. Mandel prezintă date noi cu privire la încorporarea florouracilului în celule nefracționate, în formațiuni subcelulare și în fracțiunile de ARN mesager, ribozomal și de transfer. Se arată de asemenea consecințele formării unor astfel de compuși analogi ai ARN asupra biosintezei proteice.

În capitolul IV, „Biosinteza organitelor : cloroplastul", de R. M. Smillie și N. S. Scott, sînt tratate mecanismele de reglare a sintezei organitelor subcelulare din celulele vegetale : cloroplastele, comparativ cu cele ale sintezei mitocondriilor. Sînt expuse apoi proprietățile și sinteza acizilor nucleici din cloroplaste, precum și rolul lor în sinteza proteinelor cloroplastice. În încheiere se face o analiză a proceselor de fotoreglare în organitele subcelulare.

În ultimul capitol, „Macromoleculele și funcțiunea creierului", B. W. Agranoff discută unele aspecte biochimice ale interrelațiilor deosebit de complexe care stau la baza activității nervoase superioare.

Fiecare capitol este însoțit de numeroase indicații bibliografice. Lucrarea se adresează biologilor, biochimiștilor, medicilor și tuturor acelora care se preocupă de problemele majore ale biologiei contemporane.

Ștefan Hulea

Institutul de biochimie, București

Protein growth by plant breeding (*Sporirea producției de proteine prin ameliorarea plantelor*), ed. A. BÁLINT, Akadémiai Kiadó, Budapesta, 1970, 179 p.

Prezenta lucrare se ocupă cu studiul îmbunătățirii soiurilor de porumb, mazăre și secară cultivate în Ungaria. Pentru o considerabilă parte a populației lumii, problema surselor de hrană este foarte stringentă, pentru că acestea sînt adeseori inadecvate și insuficiente. În special deficitul de proteine este îngrijorător. Acest deficit se ridică la 1,8 milioane t de proteine animale și 0,4 milioane t de proteine vegetale. Obținerea produselor animale este condiționată de produsele vegetale cu care sînt furajate animalele. Dintre acestea porumbul este foarte important (70% în Ungaria), fiind suplimentat cu mazăre, care are un conținut în proteine mai ridicat și o mai bună compoziție în aminoacizi. Grîul (3,6 milioane t de proteine) trebuie să fie suplimentat cu secară din soiuri cu conținut de proteine îmbunătățit.

Lucrarea cuprinde cinci capitole : A. Bálint, „Îmbunătățirea compoziției chimice a boabelor de porumb prin ameliorare" ; L. Mészáros, „Efectul mentorului sexual asupra conținutului în proteină brută în porumb" ; Gizella Kotvics, „Cercetări pentru creșterea conținutului în proteine la *Secale cereale* L." ; J. Füredi, „Importanța ameliorării mazării în sensul sporirii conținutului de proteină" ; D. Dudits și J. Sutka, „Modificarea genetică a caracterelor la mazăre prin mutații".

Lucrarea prezintă comparativ numeroase date și indici biochimici, discutați din punct de vedere genetic. Sînt expuse 81 de tabele cu rezultate și 54 de figuri, din care 12 fotografii. Sînt citate 213 referințe bibliografice. Este dat și cîte un index de autori și de subiecte. Fiecare capitol se termină cu un rezumat.

Lucrarea este utilă biochimiştilor, agrochimiştilor, precum şi geneticienilor şi amelioratorilor de plante.

Condiţia grafică a cărţii este foarte bună.

Florin Mihăilescu

Institutul de biochimie, Bucureşti

The 34th Annual Conference of the Hungarian Physiological Society, Debrecen 4—6 July 1968 (A 34-a Conferinţă anuală a Societăţii ungare de fiziologie), sub redacţia lui K. LISSÁK, Akadémiai Kiadó, Budapesta, 1970, 223 p.

Rezumatele Conferinţei anuale a Societăţii ungare de fiziologie din 4—6 iulie 1968 apar pentru prima dată în volum separat, pînă acum fiind publicate în suplimentele revistei „Acta Physiologica Hungarica".

Volumul de faţă cuprinde rezumatele a aproape 200 de lucrări, în ordinea prezentării lor la conferinţă. Ele sînt din diferite domenii ale ştiinţei, şi anume fiziologie, toxicologie, farmacologie, endocrinologie, genetică şi biochimie. O serie de probleme sînt cercetate în funcţie de stările fiziologice ale organismului.

Dintre lucrări menţionăm unele cercetări de biochimie, cum sînt, de exemplu, „Activitatea fosfatazei din ser în şocul hemoragic", „Relaţii între transportul ATP şi fosfataza dependentă de K^+ în ţesutul cerebral", „Efectul conformaţional al fosforilazei *b* asupra formării fosforilazei *a*", „Schimbări în proprietăţile alosterice ale fosforilazei *a*", „LDH din ser şi izoenzimele", „Rolul metabolismului lipidic în furnizarea de energie" şi „Separarea corticosteroizilor prin cromatografie în strat subţire".

Prin publicarea acestui volum avem posibilitatea de a obţine o privire generală asupra preocupărilor oamenilor de ştiinţă maghiari.

Natalia Moldoveanu

Institutul de biochimie, Bucureşti

A. B. ROY, P. A. TRUDINGER, *The biochemistry of inorganic compounds of sulphur* (Biochimia compuşilor anorganici ai sulfului), Cambridge Univesity Press, 1970, 400 p.

Compuşii anorganici ai sulfului prezintă un interes deosebit, prin rolul pe care îl au în metabolismul steroizilor, în bolile sistemului nervos central, în fertilitatea solului, în coroziune, în primele etape ale evoluţiei vieţii etc. Autorii lucrării de faţă realizează o sinteză

a literaturii referitoare la problemele menţionate, evidenţiind nivelul actual al cunoştinţelor în domeniile respective şi căile ce se deschid pentru cercetări viitoare.

Primele trei capitole prezintă chimia şi metodologia sulfului, utile pentru informarea generală şi pentru munca de laborator. Următoarele patru capitole descriu enzimele sulfului, iar în alte trei capitole se discută metabolismul sulfului anorganic la microorganisme, plante şi animale. Scopul principal al cărţii fiind tratarea problemelor legate de compuşii anorganici ai sulfului, compuşii organici ai acestui element sînt menţionaţi numai în măsura în care interferează în metabolismul celor anorganici. Ultimele două capitole au ca subiect chimia clinică a sulfului şi importanţa economică a acestuia (fertilitatea solului, coroziunea, depozitele de sulf şi sulfuri, tehnologia petrolului etc.). Lucrarea se încheie cu o listă bibliografică de 42 p., un index de autori şi subiecte.

Prin originalitatea subiectului şi prin bogăţia informaţiei, ea se recomandă ca un bun îndreptar pentru cei interesaţi.

Constanţa Muşolan

Institutul de biochimie, Bucureşti

„*Animal blood groups and biochemical genetics*" („Grupele sangvine la animale şi genetica biochimică"), ed. dr. C. C. OOSTERLEE, publicată de Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, Netherlands, vol. 1, nr. 1, 1970, 66 p.

Această nouă publicaţie ştiinţifică a luat naştere sub egida Societăţii europene de cercetare a grupelor sangvine la animale. Revista urmăreşte, pe de o parte, încurajarea cercetării caracterelor aflate sub control genetic la animale şi, pe de altă parte, asigurarea schimbului de informaţii în acest domeniu. În nota către cititor, care prefaţează primul număr al revistei, M. Braend, preşedintele Societăţii europene de cercetare a grupelor sangvine la animale, dă indicaţii cu privire la conţinutul acestei publicaţii: contribuţii originale în cercetarea fundamentală şi aplicativă a grupelor sangvine la animale, comunicări scurte, rapoarte şi informaţii relative la activitatea societăţii. Un loc important va fi ocupat de diverse studii de imunogenetică (fuziune a două ramuri ale biologiei: imunologia şi genetica), precum şi de cercetările de identificare pe cale electroforetică a caracteristicilor polimorfe suplimentare ale sîngelui.

Revista va apărea de patru ori pe an, cu un total de 256 de pagini.

Primul număr cuprinde şapte lucrări originale şi două comunicări scurte, cu ilustraţii şi referiri bibliografice numeroase.

Animal Blood Groups and Biochemical Genetics se adresează în special biologilor, medicilor hematologi şi biochimiştilor.

Lucia Doina Popov

Institutul de biochimie, Bucureşti

International symposium on metabolism, physiology and clinical use of pentoses and pentitols (Simpozion Internaţional despre metabolismul, fiziologia şi utilizarea clinică a pentozelor şi pentitolilor), Hakone, Japonia, 27—29 august 1967, sub redacţia lui B. L. HORCKER, K. LANG, Y. TAKAGI, 1969, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, New York, 408 p., 254 fig.

Problematica tratată în acest simpozion, primul cu un astfel de subiect, deşi relativ recentă, este de o reală importanţă ştiinţifică.

Studiilor teoretice asupra metabolismului pentozelor şi al pentitolilor, începute şi fundamentate în S.U.A., li s-au adăugat cele fiziologice, farmacologice şi toxicologice, întreprinse în special în Germania şi Japonia. De asemenea sînt prezentate rezultatele obţinute atît în ceea ce priveşte efectele terapeutice, cît şi acţiunea în diverse metabolisme intermediare a unor preparate farmaceutice dintre care se evidenţiază xilitolul.

Simpozionul a fost format din trei secţii, prima avînd ca temă „Metabolismul pentozelor şi al pentitolilor". Remarcăm, dintre numeroasele comunicări prezentate, pe acelea cu următoarele subiecte: rolul pentozelor în diferite organe (B. L. Horecker), tulburări ale căii acidului uronic care generează pentozurii (O. Touster), pentozele care intră în structura mucopolizaharidelor şi glicoproteinelor (L. Rodden).

În cea de-a doua secţie, „Fiziologia pentozelor şi a pentitolilor", care a fost şi cea mai amplu discutată, s-au prezentat comunicări care au tratat despre căile de metabolizare a xilitolului la animale şi la om (K. Lang), în eritrocite (T. Asakura), în muşchiul cardiac (H. Bickei, W. Feki), precum şi despre efectul provocat de xilitol în diabet (N. Nosoya şi colab.), în secreţia de insulină (K. Kosaka), asupra glucidelor sangvine (Y. Sihigeta şi colab.), asupra metabolizării lipidelor (K. Opitz).

Utilizarea clinică a pentozelor şi a pentitolilor a constituit tema celei de-a treia secţii. Dintre subiectele tratate, le citäm pe acelea referitoare la efectul administrării intravenoase a xilitolului asupra hepatitei şi diabetului (H. Mehnert şi colab.), asupra metabolismului glucidelor (H. Ishii), prevenirea de către xilitol a efectului de supresiune a funcţiunii adrenocorticale în terapia steroidică (O. Ohnuri), utilizarea xilitolului în pediatrie (M. Kumagai).

Îmbinarea dintre prezentările de sinteză şi articolele originale, bogata bibliografie, graficele intuitive, redactarea sobră şi clară, precum şi varietatea aspectelor prezentate, fac ca materialele acestui simpozion să constituie un valoros material de studiu.

Dinu Tănăsescu

Institutul de biochimie, Bucureşti

Advances in Enzyme Regulation (Progrese în reglarea enzimatică), ed. G. WEBER, Pergamon Press, Oxford-New York-Toronto-Sydney-Braunschweig, 1970, vol. 8, 389 p.

Volumul 8 al acestei apreciate publicaţii anuale păstrează linia propusă de la primul său număr, şi anume includerea în materialele sale numai a aspectelor legate direct de reglările enzimatice ale unor procese de mare interes teoretic sau practic. Selecţionarea acestor procese de reglare este făcută cu mult discernămînt, iar autorii capitolelor respective sînt cu toţii cercetători binecunoscuţi prin competenţa lor ştiinţifică.

Materialul, foarte condensat, este bogat ilustrat și susținut de o bogată bibliografie.

Aspectele cercetate în cele 10 capitole ale volumului sînt următoarele: „Mecanismele de control din metabolismul carbohidraților" (trei articole: rolul hormonilor și al substratelor în reglarea gluconeogenezei; efectul inhibitor al fenilalaninei și fenilpiruvatului; proprietățile cinetice și fizice ale fosfofructokinazei), „Controlul metabolic și enzimatic al sistemelor de zbor" (două articole: modularea enzimatică a desoxicitidilat desaminazei și timidilat sintetazei; aspecte filogenetice ale mecanismelor de reglare a metabolismului glutaminei), „Mecanisme de control la microorganisme" (două articole: reglarea metabolismului de către ATP; forme moleculare multiple ale glutamin sintetazei produse enzimatic), „Reglarea în diferite organe" (trei articole: metabolismul oxidativ al ficatului; procese de reglare a țesutului adipos; enzimele din ficatul în regenerare), „Reglarea enzimalor din metabolismul glicogenului" (trei articole: controlul sintezei glicogenului hepatic; stimularea unei kinaze din inimă; reglarea fosforilazei din mușchii cardiaci și scheletici), „Reglări prin acțiunea hormonilor" (două articole: interacțiunea insulină-receptori; reglarea flavoproteinelor), „Inducerea enzimelor *in vitro*" (două articole: dezvoltarea spontană a activității tirozin aminotransferazei; controlul colagenolizei), „Reglarea izoenzimelor" (două articole: izoenzimele glutaminazei în hepatoame; reglarea sintezei izoenzimelor serin dehidratazei), „Mecanismul de control în tumori" (trei articole: inducerea enzimelor în hepatoame; precursorii colesterolului în țesuturile tumorale; alterări ale activității enzimatice în tumori) și, în sfîrșit, „Controlul ciclului acizilor tricarboxilici" (un articol de sinteză).

Prin tematica și conținutul său, acest volum se înscrie, ca și celelalte volume de altfel, printre cele mai apreciate apariții biochimice anuale.

Dinu Tănăsescu

Institutul de biochimie, București

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici ca: Viaţa ştiinţifică, în care prin scurte note, sînt aduse la cunoştinţa cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei: congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc. Recenzii — în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea aceloraşi date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc., se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie: str. Docenţilor nr. 20, Bucureşti 63, Sectorul I.

MAGYAR MŰSZAKI KÖNYVTÁR
1883

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA
ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

E. MACOVSCHI, **Biostructura**, 1969, 258 p., 18,50 lei.

M. ŞERBAN şi D. COTARIU, **Biochimia contracţiei musculare**, 1970, 240 p., 20,50 lei.

R. PORTOCALĂ şi L. POPA, **Acizii ribonucleici celulari şi virali**, 1966, 375 p. + 8 pl., 26 lei.

M. G. BALŞ, **Imunofluorescenţă şi aplicaţiile ei în inframicrobiologie**, 1966, 285 p., + 18 pl., 27 lei.

ION CANTACUZINO, **Opere alese, Œuvres choisies**, 1965, 687 p., 44 lei.

* * * **Omagiu acad. prof.** RALUCA RIPAN, 1966, 628 p. + 2 pl., 50 lei.

1971 MAR 19

La revue „Studii şi cercetări de biochimie" paraît 4 fois par an. Toute commande à l'étranger sera adresée à Întreprinderea de comerţ exterior — Libri, Boîte postale 134—135 Bucarest, Roumanie ou à ses reprèsentants à l'étranger. En Roumanie, vous pourres vous abonner par les bureaux de poste ou chez votre facteur.

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 14, NR. 1, P. 1 — 118, BUCUREŞTI, MARTIE, 1971

I. P. „Informaţia" — c. 6118

43816

Lei 20.—

F 1330

04

studii şi cercetări de biochimie

2

TOMUL 14

1971

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 14, nr. 2, p. 119—234, Bucureşti, iunie, 1971

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România;
M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacție:

VICTOR GHEȚIE

Revista apare de 4 ori pe an.

Prețul unui abonament anual este de 80 lei.

În țară abonamentele se fac la oficiile poștale, agențiile poștale, factorii poștali și difuzorii voluntari din întreprinderi și instituții.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se fac prin Întreprinderea de comerț exterior—LIBRI, Căsuța poștală 134—135 (Calea Victoriei 126), București, România, sau prin reprezentanții săi din străinătate.

Manuscrisele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență se vor trimite pe adresa comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie".

ADRESA REDACȚIEI:
București, str. Docenților, nr. 20
Sectorul I

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
BIOCHIMIE

Tom 14, nr. 2 1971

SUMAR

Pag.

C. BILAUS, E. NICOARĂ, C. BODEA, I. PETRESCU, Asupra carotinoidelor din crustaceul decapod Pachygrapsus marmoratus 123

I. BRAD, Contribuţii la studiul biochimiei rezistenţei la ger a cerealelor de toamnă. VIII. Studiul comparativ al conţinutului de cenuşă, fosfor şi potasiu . . . 127

L. BUZILĂ, D. ONICĂ, V. GHEŢIE, Resorbţia şi persistenţa în circulaţie a gamma-globulinei administrate intramuscular la iepure 135

G. ENĂCHESCU, D. BUNESCU, Corelaţii între unele grupe de componente chimice ale fructelor de tomate 143

T. FRITS, S. GABOR, Z. ANCA, Conţinutul în pentoze şi fosfor „acidosolubil" al plămînilor în silicoza experimentală la şobolan 157

S. MIHĂESCU, V. GHEŢIE, Hidroliza cu catepsina E a imunoglobulinei G de iepure 163

C. MOTAŞ, V. GHEŢIE, S. MIHĂESCU, Degradarea regiunii Fc din imunoglobulina G de iepure de către catepsinele lizozomiale 171

A. I. POPESCU, Un model teoretic al cuplajului dintre reacţiile biochimice şi difuzia printr-o membrană celulară 177

M. RABEGA, Zaharurile hidrosolubile reducătoare eliberate din biostructura unor frunze sub acţiunea 2,4-dinitrofenolului şi a azidei de sodiu 191

M. ŞERBAN, D. COTARIU, Comportarea malat dehidrogenazelor din muşchii netezi de diferite vertebrate la variaţia pH-ului şi la denaturare termică şi cu uree 197

M. ŞERBAN, M. ŞERBAN, Efectul cortizolului asupra lactat dehidrogenazei şi a izoenzimelor sale din ficat şi ser în intoxicaţia experimentală acută şi cronică cu tetraclorură de carbon 203

F. ZETEA, C. BODEA, Conţinutul de carotinoide al boabelor unor hibrizi de porumb în comparaţie cu genitorii lor 211

REFERAT GENERAL

G. NEAMŢU, Rolul pigmenţilor carotinoidici în organismele vegetale 215

RECENZII 229

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
BIOCHIMIE

Tome 14, No. 2 1971

CONTENTS

Page

C. BILAUS, E. NICOARĂ, C. BODEA, I. PETRESCU, The carotenoids of the crustacean decapod Pachygrapsus marmoratus 123

I. BRAD, Contributions to the biochemical study of frost resistance in autumn cereals. VIII. Comparative study of ashes, phosphorus and potassium contents 127

L. BUZILĂ, D. ONICĂ, V. GHEŢIE, Resorption and persistence within rabbit circulation of intramuscularly administered gamma-globulin 135

G. ENĂCHESCU, D. BUNESCU, Correlations of some tomato chemical compound groups 143

T. FRITS, S. GABOR, Z. ANCA, Pentose and acidosoluble phosphorus content in rat lungs during experimental silicosis 157

S. MIHĂESCU, V. GHEŢIE, Digestion of rabbit immunoglobulin G by cathepsin E 163

C. MOTAŞ, V. GHEŢIE, S. MIHĂESCU, Breakdown of the rabbit immunoglobulin Fc region by lysosomal cathepsins 171

A. I. POPESCU, A theoretical model of coupling biochemical reactions with the passive diffusion through a cellular membrane 177

M. RABEGA, Hydrosoluble reducing sugars released from the biostructure of certain leaves under the action of 2,4-dinitrophenol and natrium azide. . . . 191

M. ŞERBAN, D. COTARIU, The behaviour of smooth muscle malate dehydrogenase in different vertebrates against variations of pH and after temperature and urea inhibition 197

M. ŞERBAN, M. ŞERBAN, The effect of cortisol upon liver and serum lactate dehydrogenase and its isoenzymes during acute and chronical experimental carbon tetrachloride intoxication 203

F. ZETEA, C. BODEA, Carotenoid content in the seeds of some corn hybrids as compared to their genitors 211

REVIEW

G. NEAMŢU, The role of carotenoids pigments in vegetables. 215

BOOK REVIEW 229

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 2, 123–125 (1971)

ASUPRA CAROTINOIDELOR DIN CRUSTACEUL DECAPOD PACHYGRAPSUS MARMORATUS

CORINA BILAUS, ELENA NICOARĂ, C. BODEA *) şi I. PETRESCU **)

Rezumat. A fost intreprins un studiu comparativ, pe organe şi sexe, al carotinoidelor din crustaceul decapod Pachygrapsus marmoratus. S-a constatat o pigmentare mult mai puternică a hepatopancreasului în comparaţie cu celelalte organe. Ca pigmenţi principali au fost identificaţi β-carotina în hepatopancreas şi astaxantina în celelalte organe, însoţite de xantofile şi cantaxantină. La femele toate organele, cu excepţia pedunculilor oculari, sînt mai sărace în carotinoide decît cele ale indivizilor masculi, ceea ce s-ar putea corela cu bogăţia în carotinoide a ouălor.

În cercetări anterioare asupra distribuţiei pigmenţilor carotinoidici, pe organe şi sexe, la crustaceul decapod Macropipus holsatus [1] am observat diferenţe atît în ce priveşte conţinutul total de carotinoide cît şi în ce priveşte raportul dintre ele.

Pentru a vedea dacă aceste diferenţe se regăsesc şi la alte specii de crustacei, am extins cercetările asupra unui alt crustaceu decapod, Pachygrapsus marmoratus, crabul de piatră, specie petricolă bine reprezentată în Marea Neagră [2]. Am considerat interesant ca, paralel cu cercetarea carotinoidelor din organele femelelor, să urmărim conţinutul acestor pigmenţi şi în ouă, care apar intens colorate.

MATERIAL ŞI METODĂ

Materialul cercetat a constat din 22 indivizi masculi şi 27 femele, recoltaţi în vara anului 1968 la Agigea şi disecaţi în : hepatopancreas, pedunculi oculari, pereiopod I, pereiopod II—V şi resturi corporale, precum şi din ouăle a 15 femele. Păstrarea s-a făcut în metanol.

Pigmenţii au fost extraşi, separaţi, identificaţi şi dozaţi după metoda întrebuinţată de noi în lucrările anterioare [1], [3].

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Conţinutul total în carotinoide al diferitelor organe, raportat la 100 g substanţă uscată, este redat în tabela 1, iar în tabela 2 este redat conţinutul în carotinoide raportat la 10 indivizi.

*) Pentru partea chimică
**) Pentru partea biologică

Din tabela 1 se remarcă discrepanța între conținutul în pigmenți carotinoidici al hepatopancreasului și al celorlalte organe, hepatopancreasul avînd un conținut deosebit de ridicat în carotinoide. Acest conținut este mai mare la indivizii masculi decît la femele, spre deosebire de specia precedent analizată [1], unde hepatopancreasul femelelor era cu mult mai bogat în pigmenți decît al indivizilor masculi.

Este interesant de remarcat faptul că ouăle sînt foarte bogate în carotinoide, cantitatea de pigment aflată în ouăle a 10 femele întrecînd cantitatea însumată de toate organele aceluiași număr de femele (tabela 2)

Tabela 1

Conținutul total în pigmenți carotinoidici al diferitelor organe de Pachygrapsus marmoratus (mg/100 g substanță uscată)

Organul	♂	♀
Pedunculi oculari	5,16	6,94
Pereiopod I	0,41	0,31
Pereiopode II—V	0,32	0,01
Hepatopancreas	26,80	20,60
Resturi corporale	0,88	0,56

Tabela 2

Conținutul în pigmenți carotinoidici al diferitelor organe de Pachygrapsus marmoratus (mg/10 indivizi)

Organul	♂	♀
Pedunculi oculari	0,007	0,015
Pereiopod I	0,071	0,024
Pereiopode II—V	0,046	0,002
Hepatopancreas	0,295	0,204
Resturi corporale	0,272	0,091
Ouă		0,407

Tabela 3

Raportul între diferitele carotinoide la specia Pachygrapsus marmoratus, în fracțiuni din întreg

Organul și sexul	Pigmentul				
	β-Carotină	Cantaxantină	Astaxantină	Luteină Zeaxantină	Alte xantofile
Pedunculi oculari	0,35	0,05	0,37	0,15	0,08
	0,35	—	0,38	0,15	0,12
Pereiopod I	0,15	0,15	0,55	0,05	0,10
	0,20	0,15	0,47	0,08	0,10
Pereiopode II—V	0,10	0,10	0,70	0,05	0,05
	0,30	0,15	0,40	0,05	0,10
Hepatopancreas	0,37	0,03	0,37	0,06	0,02
	0,65	0,01	0,21	0,02	0,11
Resturi corporale	0,20	—	0,43	0,02	0,35
	0,26	0,02	0,30	0,08	0,34

Repartizarea diferitelor carotinoide, pe organe şi sexe, este dată în tabela 3, din care reiese că şi în cazul acestei specii pigmentul principal este astaxantina, a cărei predominanţă faţă de ceilalţi pigmenţi este în general mai pregnantă la indivizii masculi.

β-carotina se găseşte în toate organele, predominînd, la fel ca la decapodele precedent analizate [1], [3], în hepatopancreas. Ea se găseşte în cantităţi mai mari la femele.

Xantofilele se află mai mult în exoschelet, iar cantaxantina numai în hepatopancreas.

Ouăle conţin ca pigment principal astaxantina, fapt constatat şi la alţi crustacei [4], şi cantităţi apreciabile de xantofile.

Pigmentarea mai slabă, în special a hepatopancreasului, la femele decît la indivizii masculi se datoreşte, credem, faptului că femelele de Pachygrapsus analizate erau în majoritate cu ouă. O parte a pigmenţilor din hepatopancreas ar fi posibil să fi trecut în ouă. Acest fapt ne-a sugerat ideea ca pe viitor selectarea materialului să se facă şi în funcţie de etapele de dezvoltare.

Concluzii mai generale, care se vor putea trage din aceste date şi din cercetările noastre asupra altor crustacei decapozi, cu privire la distribuţia şi metabolismul carotinoidelor, vor fi formulate într-o lucrare viitoare.

Prezentată la redacţie la 4 noiembrie 1970

Catedra de biochimie
Institutul agronomic „Dr. P. Groza"
Cluj

BIBLIOGRAFIE

1. C. Bilaus, E. Nicoară, C. Bodea, I. Petrescu, St. cerc. biochim., **13**, *1*, 15 (1970).
2. Mihai Băcescu, *Decapoda*, în *Fauna Republicii Socialiste România, Crustaceea*, **IV**, *9* (1967).
3. E. Nicoară, C. Bilaus, C. Bodea, I. Petrescu, St. cerc. biochim., **13**, *1*, 65 (1970).
4. C. Bodea, E. Nicoară, G. Illyes, M. Şerban, St. cerc. biochim., **8**, *3*, 27 (1965).

THE CAROTENOIDS OF THE CRUSTACEAN DECAPOD PACHYGRAPSUS MARMORATUS

SUMMARY

A comparative study, on organs and sexes, of carotenoids from the crustacean decapod Pachygrapsus marmoratus has been performed. A stronger pigmentation of the hepatopancreas in comparison with the other organs was found. As main pigments β-carotene in hepatopancreas and astaxanthin in the other organs, along with canthaxanthin and xanthophylls were found. Except for the eyes, all the organs of females are less pigmented than those of males, a fact which could be correlated with the carotenoid abundance in eggs.

ST. CERC. BIOCHIM. 14, 2, 127–134 (1971)

CONTRIBUȚII LA STUDIUL BIOCHIMIEI REZISTENȚEI LA GER A CEREALELOR DE TOAMNĂ

NOTA VIII. STUDIUL COMPARATIV AL CONȚINUTULUI DE CENUȘĂ, FOSFOR ȘI POTASIU

I. BRAD

Rezumat. Sînt prezentate date referitoare la conținutul de cenușă, fosfor și potasiu legate de rezistența la ger a cerealelor de toamnă.

Conținutul de cenușă manifestă tendința unor valori mai mari, foarte ușor crescute la frunză față de nodul cu hipocotil și la planta mai puțin rezistentă (ca specie) față de planta mai rezistentă. În funcție de temperatură, conținutul de cenușă scade atunci cînd scade temperatura, indiferent de organ și de rezistență, sensul general al fenomenului fiind paralel cu sensul variației temperaturii.

Conținutul de P_2O_5 este mai mare în nodul cu hipocotil decît în frunză la toate plantele. La planta mai rezistentă, conținutul este mai mare decît la planta mai puțin rezistentă. Indiferent de organ și de rezistență, conținutul de P_2O_5 scada o dată cu scăderea temperaturii, iar scăderile sînt proporțional mai mici la planta mai rezistentă. Față de demineralizarea totală, demineralizarea fosforică este mai puțin intensă.

La plantele mai rezistente potasiul se găsește în cantități mai mari în perioada cu temperaturi scăzute, avînd tendința de a ajunge mai mare la nodul cu hipocotil față de frunză. Conținutul de potasiu scade de asemenea o dată cu scăderee temperaturii, crescînd o dată cu creșterea temperaturii.

Conținutul de substanțe minerale în general și de fosfor și potasiu în special, alături de influența fosforului și potasiului asupra condițiilor biochimice din planta supusă temperaturilor scăzute, a constituit subiectul a numeroase cercetări. Majoritatea lucrărilor [1], [2] se pronunță în favoarea efectului pozitiv al fosforului și potasiului. Levitt [2] citează autori care constată scăderea rezistenței sub influența fosforului și potasiului. Levitt [2] consideră chiar că un conținut mai salin conferă sensibilitate la ger. Gunar și colaboratorii [3] arată că raportul potasiu/calciu scade cînd rezistența crește, iar Ivanova [4] constată micșorarea conținutului de fosfor total la scăderea temperaturii. Puia [5] arată că între rezistența la ger și absorbția fosforului ar exista o corelație pozitivă.

Cercetările noastre au urmărit să stabilească variația conținutului de cenușă, fosfor și potasiu în corelație cu ceilalți indici analizați (Brad [6] — — [12]), pentru a putea face unele precizări în legătură cu conținutul în aceste substanțe, rezistența la ger și aplicarea acestora ca îngrășămînt.

MATERIAL ŞI METODE

În una din lucrările prezentate anterior [6] se dau indicaţii referitoare la alegerea variantelor, recoltarea probelor, pregătirea lor, date privitoare la variaţiile de temperatură şi precipitaţii. Pentru determinarea cenuşii s-a folosit metoda gravimetrică de calcinare la 450°C a materialului vegetal, iar rezultatele au fost exprimate în procente de K_2O din substanţa absolut uscată. Dozarea potasiului s-a făcut la fotometrul cu flacără. Rezultatele au fost exprimate în procente din substanţa absolut uscată. Fosforul s-a determinat cu fotocolorimetrul Lange cu lumină monocromatică albastră, prin metoda cu metavanadat [13]. Rezultatele au fost exprimate în mg P_2O_5 la 100 g substanţă absolut uscată.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele obţinute sînt prezentate în tabelele 1—6.

Analizînd rezultatele din tabela 1, constatăm că orzul conţine cantitatea cea mai mare de substanţe minerale, iar între secară şi grîu se constată o egalitate a valorilor. Conţinutul de cenuşă creşte în 1959 — 1960 faţă de 1958 — 1959 o dată cu creşterea temperaturii medii şi a volumului de precipitaţii [6].

Comparînd rezultatele constatate la frunză faţă de nod, nu se constată diferenţe sistematice, valorile medii fiind foarte apropiate. În peri-

Tabela 1

Variaţia conţinutului de cenuşe exprimată în g% substanţă uscată în nodul cu hipocotil şi frunzele de secară, grîu şi orz (1958 – 1960)

Data	Frunza			nod cu hipocotil		
	secară	grîu	orz	secară	grîu	orz
1.XII.1958	12,02	10,94	9,04	11,30	10,04	10,34
12.XII.1958	10,48	10,82	10,78	9,35	10,78	10,04
15.XII.1958	9,80	7,20	9,96	9,12	9,90	9,48
20.XII.1958	7,18	7,36	9,12	10,44	7,02	10,10
22.XII.1958	9,94	9,98	9,88	11,16	11,16	10,62
23.XII.1958	10,54	9,94	13,04	11,26	11,18	11,48
3. I.1959	9,40	10,00	9,92	7,72	8,78	10,26
9. I.1959	7,48	7,40	8,78	7,42	7,66	9,74
12. I.1959	10,62	9,58	9,44	10,26	9,42	9,18
23. I.1959	8,90	8,56	11,96	7,48	8,18	10,42
28. I.1959	6,96	7,38	9,06	8,76	8,82	8,30
16. II.1959	7,72	6,90	8,28	7,76	7,32	7,92
25. II.1959	7,54	7,58	9,88	9,30	8,32	9,42
4. III.1959	8,44	9,54	9,92	8,25	8,20	8,68
7. III.1959	9,34	10,44	14,54	9,20	7,66	12,06
19. III.1959	10,54	12,10	10,48	10,70	8,26	12,32
23. III.1959	10,70	10,01	10,31	10,40	11,70	10,20
14.XII.1959	10,52	10,98	13,02	10,42	9,42	12,60
29.XII.1959	8,18	8,90	11,76	8,92	8,42	11,81
28. I.1960	8,64	9,18	10,20	8,14	8,38	10,74
11. II.1960	8,92	8,70	10,04	8,00	7,90	10,40
24. III.1960	12,00	11,16	12,34	11,82	11,40	12,76

oadele cu temperaturi scăzute (15 — 20. XII 1958, 28. I — 16. II. 1959, 29. XII 1959, 28. I — 11. II 1960) se constată o demineralizare puternică, mai intensă la secară decît la grîu și orz, dar mai slabă la nod decît la frunză.

Aceste constatări duc la concluzia că un conținut global mai mare de substanțe minerale nu contribuie obligatoriu la mărirea rezistenței la ger. Demineralizarea ar apare astfel ca un răspuns la scăderea temperaturii, prin care s-ar favoriza mărirea rezistenței.

Analiza tabelei 2 arată că la nutriția diferențiată cu exces de fosfor și potasiu există tendința unei demineralizări mai puțin accentuate în

Tabela 2

Variația conținutului de cenușă, exprimată în g% substanță uscată, în frunza și nodul cu hipocotil de orz, cultivat pe teren neîngrășat și îngrășat cu NPK în diferite proporții (1959 – 1960)

Data	frunză						nod cu hipocotil					
	NPK 000	NPK 111	NPK 311	NPK 131	NPK 113	NPK 333	NPK 000	NPK 111	NPK 311	NPK 131	NPK 113	NPK 333
7. III.1959	10,54	—	13,02	12,62	13,20	—	12,06	—	12,38	17,82	13,02	—
19. III.1959	10,48	—	10,96	11,32	11,32	—	10,32	—	10,01	12,90	13,18	—
23. III.1959	10,31	—	11,02	16,12	11,48	—	10,20	—	10,46	13,12	11,12	—
14.XII.1959	13,02	12,20	12,06	12,34	12,36	12,94	12,60	13,90	12,72	13,44	14,32	13,92
29.XII.1959	11,76	12,82	9,98	10,96	12,94	13,18	11,81	11,40	10,84	13,10	12,68	11,18
28. I.1960	10,20	10,72	9,08	10,98	10,52	10,18	10,74	11,14	9,30	10,54	11,32	10,58
11 II.1960	10,04	10,30	9,44	10,22	10,36	10,04	10,40	10,60	9,72	10,44	10,18	9,86
24. III.1960	12,34	10,90	10,94	10,88	11,34	11,00	12,76	11,52	11,72	11,78	12,08	12,18

perioadele cu temperaturi scăzute. Valorile pentru cenușă au tendința de creștere față de varianta cu trei doze de azotat. Față de această variantă, demineralizarea este mai slabă, așa cum se constată în perioada 28.I-11.II 1960. La aceste variante agrotehnice există tendința de creștere a cenușei din nod față de frunze prin valori mici. Aceste rezultate ne fac să completăm concluzia anterioară, prin afirmația că este necesar să se ia în considerație raportul diferitelor substanțe ce se găsesc în cenușă. Azotatul de amoniu, superfosfatul sau sarea potasică, date în proporții diferite în sol, pot determina la un conținut egal de cenușă, un raport diferit al substanțelor minerale. Diferențele între variantele agrotehnice referitoare la P și K din plante sînt mai mici decît cele constatate la alți indici între aceleași variante [6] — — [12]. Rezultatele sînt similare cu cele constatate de Kadrev [14].

Din tabela 3 rezultă un conținut de fosfor mai mare în nodul cu hipocotil decît în frunză, rezultate asemănătoare cu cele obținute de Korovin [15]. Conținutul în fosfor este mai mic la orz, mai ales în perioadele cu temperaturi scăzute. Aceste constatări permit să se tragă concluzia că un conținut mai mare de fosfor este favorabil rezistenței la ger. Deoarece conținutul de cenușă este cel mai mare la orz, rezultă că rezistența este condiționată evident de raportul cenușă/fosfor, fiind mai mare atunci cînd acest raport este mai mic. Demineralizarea prin pierdere de fosfor este mai mică la secară și grîu și mai mare la orz față de demineralizarea totală constatată la cenușă, care este mai mare la secară și mai mică la orz. Amintindu-ne însă că conținutul de zaharuri este mai mare la secară [9], activitatea catalazei [7] și peroxidazei mai mică [8], respirația mai mică [12],

Tabela 3

Variația conținutului de P_2O_5 exprimată în mg % substanță uscată în nodul cu hipocotil și frunzele de secară, grîu și orz (1958–1960)

Data	frunze			nod cu hipocotil		
	secară	grîu	orz	secară	grîu	orz
1.XII.1958	561	564	590	690	688	653
12.XII.1958	735	773	616	1 489	1 306	1 306
15.XII.1958	927	979	750	1 123	1 230	1 123
20.XII.1958	787	897	754	797	954	979
22.XII.1958	979	1 116	1 189	1 383	1 306	1 306
23.XII.1958	979	1 156	1 132	1 132	1 149	1 106
3. I.1959	897	711	734	978	937	956
9. I.1959	907	891	895	907	983	901
12. I.1959	855	865	830	979	1 028	969
23. I.1959	724	799	704	875	905	875
28. I.1959	741	865	653	854	1 028	835
16. II.1959	783	803	653	1 083	1 123	1 051
25. II.1959	842	816	650	960	985	967
4. III.1959	548	653	796	878	701	761
7. III.1959	489	538	408	744	790	767
19. III.1959	861	790	732	979	979	790
23. III.1959	839	979	597	1 106	1 142	968
14.XII.1959	1 028	1 072	676	1 259	1 096	816
29.XII.1959	750	930	701	1 072	1 025	714
28. I.1960	864	767	571	1 169	1 088	933
11. II.1960	769	750	701	1 088	1 008	1 008
24. III.1960	855	748	421	1 577	1 632	1 068

se poate deduce că fotofosforilarea și fosforilarea oxidativă sînt mai intense la secară, randamentul de utilizare a energiei fiind mai mare. Ca o confirmare, Proțenko [16] găsește un conținut mai mare de fosfor organic macroergic în cazurile de rezistență mai mare.

Rezultatele prezentate în tabela 4 duc la aceleași constatări în ce privește conținutul de fosfor la nod față de frunze. În frunze se constată un conținut mai mic și o demineralizare mai puternică. Deși conținutul de

Tabela 4

Variația conținutului de P_2O_5 exprimată în g % substanță uscată, în frunza și nodul cu hipocotil de orz, cultivat pe teren neîngrășat sau îngrășat cu NPK în diferite proporții (1959–1960)

Data	frunză						nod cu hipocotil					
	NPK 000	NPK 111	NPK 311	NPK 131	NPK 113	NPK 333	NPK 000	NPK 111	NPK 311	NPK 131	NPK 113	NPK 333
14.XII.1959	676	870	688	779	688	816	816	1 049	801	876	888	1 072
29.XII.1959	702	816	750	783	801	853	714	914	783	850	816	897
28. I.1960	571	653	567	691	653	864	933	979	979	1 088	1 033	1 169
11. II.1960	701	718	767	818	669	653	1 008	1 008	1 057	1 068	1 127	979
24. III.1960	421	515	441	479	427	537	1 068	1 068	1 068	1 038	1 067	1 127

fosfor este mai mic la varianta cu azotat de amoniu dat în proporție mai mare, decît la varianta cu superfosfat dat în proporție mai mare, totuși valorile nu sînt mai mici decît la martor. Diferențele față de celelalte variante care conțin cantitatea cea mai mare de fosfor nu sînt deosebit

de substanțiale. Probabil că în acest caz o mare proporție de fosfor se găsește într-o stare inactivă fiziologic sub formă de fosfor anorganic, din moment ce celelalte procese analizate sînt substanțial diferențiate [6]—[12].

Analiza comparativă a conținutului de potasiu la secară, grîu și orz, prezentată în tabela 5, arată că în perioadele cu temperaturi scăzute conținutul de potasiu este mai mare în nod față de frunză, exceptînd unele date la secară în 1958—1959 — anul cel mai geros — cînd în frunză se constată mai frecvent cantități mai mari de potasiu. Potasiul se găsește în

Tabela 5

Variația conținutului de K_2O exprimată în g % substanță uscată în frunza și nodul cu hipocotil de secară, grîu și orz (1958—1960)

Data	frunză			nod cu hipocotil		
	secară	grîu	orz	secară	grîu	orz
1.XII.1958	4,01	3,34	4,83	3,47	3,63	4,89
12.XII.1958	5,03	5,03	5,14	3,75	4,85	4,75
15.XII.1958	4,18	3,50	5,27	3,31	3,80	4,89
20.XII.1958	3,47	2,87	4,31	3,87	2,04	4,49
22.XII.1958	4,67	4,67	4,59	5,13	4,85	4,85
23.XII.1958	4,95	4,49	4,95	4,22	4,22	5,13
3. I.1959	3,09	3,09	4,06	3,59	3,31	4,57
12. I.1959	4,75	3,63	4,75	4,67	4,14	4,67
23. I.1959	3,16	2,95	3,13	2,44	3,09	3,31
28. I.1959	3,09	2,73	4,21	2,37	2,87	3,81
16. II.1959	3,02	2,93	4,22	3,61	3,38	4,22
25. II.1959	2,73	2,59	3,63	3,59	3,16	4,06
4. III.1959	2,87	3,31	4,31	3,10	2,79	4,75
7.III .1959	2,87	3,16	3,47	2,66	2,87	4,31
19. III.1959	3,47	3,47	3,80	3,02	2,87	4,57
23. III.1959	3,75	3,80	4,49	3,47	3,31	5,26
14.XII.1959	3,89	4,30	4,57	4,06	3,24	4,49
29.XII.1959	3,47	2,95	4,14	3,47	3,39	4,31
28. I.1960	3,08	2,66	2,89	3,24	3,16	4,39
11. II.1960	2,87	2,73	3,06	3,02	3,02	4,14
24. III.1960	4,14	3,80	3,97	4,49	4,67	4,85

cantitatea cea mai mare la orz. Valorile sînt de cele mai multe ori egale sau mai mici la grîu față de secară, atît în frunze cît și în nod. Potasiul se găsește deci în cantitatea cea mai mare la organul cel mai rezistent, dar nu și la specia cea mai rezistentă. Prin raportarea la substanța uscată, diferențele între nod și frunză se măresc, iar cele între orz pe de o parte și secară și grîu pe de altă parte se micșorează. Un conținut mai mare de potasiu nu este întotdeauna legat de o rezistență mai mare, deși secara are un conținut mai mare decît grîul, iar nodul cu hipocotil unul mai mare decît frunza. Potasiul se găsește în celulele plantelor de orz în condiții în care nu este posibilă o influență fiziologică puternică. Demineralizarea potasică, o dată cu scăderea temperaturii , se constată la toate speciile, dar este mai puternică la grîu, cu toate că în această perioadă conținutul de zaharuri este mai mare la grîu decît la orz. Aceasta constituie o dovadă care pledează în favoarea existenței unui procent mai mare de potasiu combinat într-o formă aparte.

Analiza rezultatelor din tabela 6 duce la constatări asemănătoare, comparînd conținutul de K_2O între frunză și nod. Se constată demineralizarea la scăderea temperaturii. Cel mai mare conținut se constată la varianta cu potasiu. Prin creșterea conținutului de potasiu se mărește conți-

Tabela 6

Variația conținutului de K_2O exprimată în g % substanță uscată în frunza și nodul cu hipocotil de orz cultivat pe teren neîngrășat sau îngrășat cu NPK în diferite proporții (1959–1960)

Data	frunză						nod cu hipocotil					
	NPK 000	NPK 111	NPK 311	NPK 131	NPK 113	NPK 333	NPK 000	NPK 111	NPK 311	NPK 131	NPK 113	NPK 333
14.XII.1959	4,57	4,67	4,49	4,57	4,89	4,67	4,49	5,26	4,94	4,94	4,85	5,09
29.XII.1959	4,14	4,14	4,06	3,89	4,97	3,97	4,31	3,89	4,49	4,85	4,81	4,49
28. I.1960	2,89	2,89	3,72	3,97	4,07	3,97	4,39	4,31	4,31	4,31	4,97	4,57
11. II.1960	3,06	3,06	4,06	3,80	4,63	3,72	4,14	4,22	4,14	4,14	4,22	4,31
24. III.1960	3,97	3,80	3,80	3,80	4,47	3,97	4,85	4,49	4,67	4,67	5,49	4,67

nutul de zaharuri [9], scade activitatea catalazei [7], scade conținutul de azot total [11], sînt protejate mai bine enzimele, [7], [8], evitîndu-se inactivarea lor o dată cu scăderea puternică a temperaturilor, mărindu-se astfel rezistența la ger. Acest potasiu activ probabil că face parte dintr-o metalenzimă cu activitate favorabilă rezistenței. De aceea credem că numai prin determinarea cantitativă globală de potasiu nu se poate realiza o triere a plantelor.

CONCLUZII

Conținutul de cenușă este mai mare la orz față de secară și grîu, este egal sau foarte puțin mai mare la frunză față de nod, tinzînd să fie mai mare la variantele cu îngrășăminte fosfatice și potasice în exces, scăzînd în toate cazurile o dată cu scăderea temperaturii, crescînd o dată cu creșterea temperaturii în timpul iernii și cu temperatura medie a anului. Conținutul global de substanțe minerale (cenușa) nu poate fi o indicație de rezistență la ger și nici conținutul mic de substanțe minerale, deși micșorarea acestui conținut în timpul iernii apare ca favorabil rezistenței. O rezistență mai mare sau mai mică, în raport cu conținutul de cenușă, pare a fi condiționată de raportul diferiților anioni și cationi.

Conținutul de fosfor este mai mare în nod față de frunză, este mai mare la secară și grîu față de orz, la varianta cu superfosfat în exces față de celelalte, și la varianta cu azotat în exces față de martor, scăzînd odată cu scăderea temperaturii, mai puternic la orz, îndeosebi în frunză. Un procent mai mare de fosfor în cenușă sau creșterea acestui procent pare a fi legat de o rezistență mai mare, în plantele mai rezistente conținutul de fosfor fiind mai mare, demineralizarea totală fiind proporțional mai mare decît demineralizarea fosforică. Raportul fosfor total/fosfor anorganic apare ca un factor de proporție important pentru triere ca și pentru interpretarea rezistenței la ger.

Conținutul de potasiu este mai mare în nodul cu hipocotil față de frunze, mai mare la orz față de grîu și mai mare la varianta cu trei doze de potasiu, conținutul lui scăzînd cu scăderea temperaturii. Conținutul de potasiu nu poate constitui un indicativ sigur al unei rezistențe mari, deși creșterea conținutului de potasiu determină creșterea rezistenței. Distribuția potasiului în celulă și determinarea fracționată a conținutului de potasiu apare de asemenea de perspectivă.

Prezentată la redacție la 20 aprilie 1970

Secția de fiziologie
ICCPT, Fundulea — București

BIBLIOGRAFIE

1. D. Davidescu, Agrochimia, Ed. a II-a, Ed. Agrosilvică, București, 1963.
2. J. Levitt, *The hardiness of plants*, Academic Press, New York, 1956.
3. I. I. Gunar, E. E. Krastina, A. E. Petrov-Spiridonov, Kukuruza, *1* (1957).
4. T. Ivanova, Fiz. Rast., **12**, 702 (1965).
5. I. Puia, *Cercetări asupra rezistenței la ger a cerealelor*, Teză de dizertație, București, 1960.
6. I. Brad, St. cerc. biochim., **8**, 163 (1965).
7. I. Brad, St. cerc. biochim., **8**, 293 (1965).
8. I. Brad, St. cerc. biochim., **9**, 11 (1966).
9. I. Brad, St. cerc. biochim., **9**, 249 (1966).
10. I. Brad, St. cerc. biochim., **9**, 347 (1966).
11. I. Brad, St. cerc. biochim., **10**, 189 (1967).
12. I. Brad, *Contribuții la studiul biochimiei rezistenței la ger a cerealelor de toamnă*. Lucrare de doctorat, 1968, București.
13. K. S. Gerike, R. Kurmies, Zeitsch. Anal. Chem., 137 (1952—1953).
14. T. Kadrev, H. Ciulgiian, Nauk. Sesiia Inst. Gheneț. Selek. rasten., *11—12*, dec. (1967) (1969).
15. A. I. Korovin, I. N. Frolov, Biol. Nauki, **12**, 70 (1969).
16. D. Proțenko, Selek. Sem-Vod, **34**, 33 (1969).

CONTRIBUTIONS TO THE BIOCHEMICAL STUDY OF FROST RESISTANCE IN AUTUMN CEREALS VIII. COMPARATIVE STUDY OF ASHES, PHOSPHORUS AND POTASSIUM CONTENTS

SUMMARY

The paper presents data about the ashes, phosphorus and potassium contents of autumn cereals, in corelation with frost resistance.

The ash content tends to higher values, very slightly increased in leaf in comparison with the node with hypocotil and in less resistant plants (as species) in comparison with the more resistant ones. Depending on temperature, the ash content decreases, no matter of organ and resistance, the general sense of the phenomenon being parallel with the variation of temperature.

The P_2O_5 content is higher in node with hypocotil than in leaf, in all plants. In more resistant plants the content is higher than in less resistant ones. No matter of organ and resistance, the P_2O_5 content decreases with the decrease in temperature; these decreases are proportionally lower in the more resistant plant. In comparison with the total demineralisation, the phosphorus demineralization is less intense.

In more resistant plants potassium occurs in higher amounts in the low temperature period reaching higher values in node with hypocotil in comparison with the leaf. The potassium content, also, decreases, with the decreases in temperature and increases, with the increase in temperature.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 2, 135 – 142 (1971)

RESORBȚIA ȘI PERSISTENȚA ÎN CIRCULAȚIE A GAMMA-GLOBULINEI ADMINISTRATE INTRAMUSCULAR LA IEPURE

LUCIA BUZILĂ, DOINA ONICĂ și VICTOR GHEȚIE *)

Rezumat. S-a comparat resorbția și persistența în sînge a gamma-globulinelor de iepure obținute atît prin metoda precipitării cu etanol, cît și prin cea a precipitării cu sulfat de amoniu urmată de cromatografia pe DEAE-celuloză. Injectată intramuscular, gamma-globulina obținută cu etanol este distrusă local într-o proporție mai mare decît cea obținută cromatografic, ceea ce face ca ultimul preparat să asigure în circulație o concentrație mai mare de gamma-globulină. Se discută factorii de circulație legați de folosirea gamma-globulinelor preparate prin cele două metode în imunoprofilaxie.

Preparatele de gamma-globulină umană folosite în prezent în scopuri terapeutice sînt obținute din serul sanguin sau sîngele placentar prin două procedee principale: precipitare cu etanol (fracțiunea II Cohn) [1] și precipitare cu săruri (sulfat de amoniu sau sodiu [2], urmată sau nu de cromatografie pe DEAE-celuloză.

Metodele de obținere a preparatelor de gamma-globulină influențează direct persistența lor în sînge. Cu cît metoda utilizată este mai „blîndă", cu atît persistența gamma-globulinei în sînge va fi mai îndelungată și șansele ca ea să-și exercite acțiunea terapeutică scontată, mai mari [3], [4]. Rezultă că metoda ideală de preparare a gamma-globulinelor trebuie să furnizeze nu numai un preparat cît mai pur cu putință, dar și într-o stare fizico-chimică cît mai apropiată de cea nativă.

Păstrarea intactă a conformației moleculare native este un deziderat cu atît mai greu de realizat, cu cît prin „stare nativă" se definește o condiție moleculară ideală care, de fapt, nu este cunoscută pentru nici o proteină. De aceea, pentru a aprecia abaterea de la starea nativă pe care o induce metoda de izolare, se măsoară timpul de înjumătățire al fiecărui preparat, marcat în prealabil cu un radionuclid și se consideră că gamma-globulina este cu atît mai corect preparată, cu cît timpul ei de înjumătățire este mai lung [4].

Cît privește resorbția gamma-globulinelor în cazul administrării lor pe calea intramusculară — cea mai folosită în terapie, — este de presupus că și ea va fi influențată de starea fizico-chimică a preparatului, dar

*) Asistența tehnică M. Ciovică

date în această direcție lipsesc. Se vor putea înregistra, în principiu, nu numai modificări la viteza de resorbție, dar și în procentul de gamma-globulină administrată care pătrunde în circulație. Cu cît preparatul conține mai multă gamma-globulină „alterată" în cursul izolării ei, cu atît mai mult material va fi distrus sau „prelucrat" la locul de inoculare, iar în circulație va pătrunde mai puțină gamma-globulină.

În lumina acestor considerații, studiul de față și-a propus să urmărească comparativ resorbția și persistența gamma-globulinelor de iepure, obținute prin cele două metode de preparare a gamma-globulinelor umane. Lucrarea urmărește să stabilească nu numai care din aceste metode furnizează un preparat mai eficient, dar și să verifice dacă măsurarea resorbției poate da informații suplimentare asupra calității preparatelor și a proceselor ce se petrec la locul de inoculare.

MATERIAL ȘI METODE

S-au utilizat iepuri de rasă Chinchilla, în greutate de aproximativ 2 kg. Cu trei zile înainte de începerea experiențelor, iepurii au primit în apa de băut o cantitate de 100 mg iodură de potasiu/litru.

Animalele s-au împărțit în două loturi, fiecare alcătuit din 6 iepuri. Un lot a fost injectat cu gamma-globulină obținută prin metoda cu etanol, iar celălalt lot a fost inoculat cu gamma-globulină obținută prin precipitare cu sulfat de amoniu și cromatografie pe DEAE-celuloză.

Prepararea gamma-globulinelor. S-a pornit de la un amestec de seruri de iepure din care gamma-globulinele s-au izolat prin : *a*) precipitare cu etanol la rece [5], *b*) precipitare cu sulfat de amoniu 40%, saturare și cromatografie pe DEAE-celuloză în tampon fosfat pH 8 .0, 0,02 M [6] și *c*) precipitare cu etanol la rece, urmată de cromatografia preparatului pe DEAE-celuloză în condițiile descrise mai sus.

Soluțiile de gamma-globuline s-au dializat față de tampon fosfat, pH 7,6, 0,15 M și apoi s-au concentrat prin dializă de concentrare față de CM-celuloză gel (Serva), pînă la o concentrație proteică de 10 — 15 mg/ml.

Marcarea gamma-globulinelor cu radioiod (^{131}I). S-a plecat de la soluția de gamma-globulină 7 mg/ml în tampon fosfat, pH 7,6, 0,15 M, peste care s-a adăugat ^{131}INa (1 mCi) fără purtător. Oxidarea s-a făcut cu cloramină T la 4°C, timp de 5 minute, după metoda lui Hunter și Greenwood [7]. Iodul nelegat de proteină a fost îndepărtat prin gel filtrare peste o coloană de Sephadex G-25, echilibrată cu soluție salină fiziologică, urmată de o dializă de 24 ore. Activitatea specifică a preparatelor a fost de 40 — 50 mCi/mg. În aceste soluții de gamma-globulină radioactivă s-a adăugat gamma-globulina nemarcată respectivă, astfel ca cele trei preparate să aibă radioactivități comparabile și cantități egale de gamma-globulină, dizolvate în volume de soluție salină fiziologică comparabile. Astfel, în cursul experiențelor efectuate, radioactivitățile inoculate au variat între 12 — 20.10^6 p/m/volumul injectat. Volumul de lichid introdus per animal a variat între 2 — 3 ml, iar cantitatea de gamma-globulină injectată a oscilat între 11 — 13 mg, astfel ca fiecare animal să primească 5 mg gamma-globulină/kg corp.

Inocularea animalelor. Întreaga cantitate de gamma-globulină radioactivă s-a administrat printr-o injecție unică în mușchiul unuia din picioarele posterioare. Sîngele s-a recoltat din vena urechii (aproximativ 3 ml) la diferite intervale de timp : 1, 4, 8, 24, 27, 30, 35, 48 ore și 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 zile. În serurile obținute s-a determinat radioactivitatea totală și cea legată de proteină (prin precipitarea a 1 ml ser cu 1 ml acid tricloracetic 10%) și s-au făcut corecțiile legate de timpul de înjumătățire a radionuclidului.

Calcularea rezultatelor. S-a reprezentat pe o scară semilogaritmică variația radioactivității totale cu timpul (vezi fig. 2). Din această curbă s-a calculat : *a*) viteza de resorbție (*Vr*), măsurată prin timpul (în ore) la care se atinge radioactivitatea maximă (*Rm*) în ser ; *b*) timpul de înjumătățire ($t^1/_2$), raportat la radioactivitatea maximă atinsă în ser și măsurată în ore de la inoculare ; *c*) procentul de radioactivitate la 7 zile (P_7) [8], calculat după formula $P_7 = 100 \frac{R_7}{R_0}$, unde R_7 reprezintă radioactivitatea măsurată în ser la 7 zile de la inoculare, iar R_0 reprezintă radioactivitatea maximă obținută prin extrapolarea curbei de variație a radioactivității serului în funcție de timp, la $t = 0$; *d*) radioactivitatea legată de proteină (R_p), exprimată în procente din radioactivitatea totală și calculată din datele obținute prin precipitare cu acid tricloracetic a serului recoltat la o oră de la inoculare ; *e*) procentul de utilizare (*PU*), care raportează cantitatea maximă de radioactivitate găsită în 1 ml ser (*Rm*), la radioactivitatea totală injectată animalului (*Ri*), după formula : $PU = 100 V \frac{Rm}{Ri}$, unde : *V* este volumul sanguin al animalului, considerat de T.J. Gill și colab. [9] egal cu $\frac{4,4}{100} G$, *G* fiind greutatea animalului în grame. Deci, pentru calcularea *PU* s-a utilizat formula : $PU = 4,4\, G \frac{Rm}{Ri}$.

Hidroliza cu papaină. Preparatele de gamma-globulină radioactivă au fost hidrolizate cu papaină, în amestecuri conținînd : 6 mg/ml proteină, 0,06 mg/ml papaină (2 x crist. NBCo), 0,01 M cisteină, 0,002 M EDTA Na_2, tampon fosfat pH 7,0, 0,15 M. Durata incubării a fost de 1 și 5 ore. S-au făcut probe de control fără enzimă. S-a determinat radioactivitatea eliberată în urma hidrolizei, ea fiind considerată ca un indice al proteolizei [10]. Valorile s-au corectat cu radioactivitatea eliberată spontan prin incubare fără enzimă, corecțiile fiind în general mici.

Electroforeza și imunoelectroforeza. S-a utilizat gel de agaroză 1%, iar condițiile de lucru au fost descrise într-o altă lucrare [11]. S-a folosit un ser de capră anti-ser de iepure, obținut prin bunăvoința dr. C. Vior de la Institutul Pasteur din București.

REZULTATE

Analizate electroforetic, preparatele de gamma-globulină obținute cu etanol sau sulfat de amoniu + DEAE-celuloză s-au dovedit omogene ele prezentînd o singură bandă electroforetică, cu o mobilitate de $1,2 \cdot 10^{-5}$

cm²/V/s. Puritatea preparatului obținut prin precipitare cu etanol este numai aparentă, deoarece la imunoelectroforeză, pe lîngă linia gamma-globulinei, se evidențiază încă 4 — 5 linii de precipitare în zona α_1 —,β-globulinelor. În aceste condiții preparatul obținut prin trecere pe DEAE-celuloză prezintă o singură linie de precipitare, indiferent dacă el a fost obținut inițial prin precipitare cu sulfat de amoniu sau etanol (fig. 1).

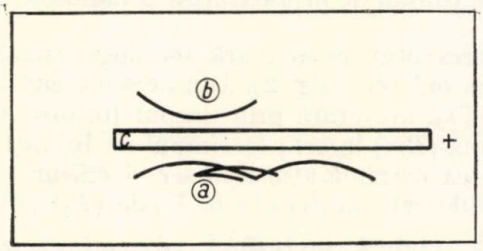


Fig. 1. — Imunoelectroforeza IgG precipitat cu etanol ca atare (*a*) și după cromatografie pe DEAE — celuloză (*b*). (*c*) ser de capră antiser de iepure

Variația radioactivității din ser în timp a fost reprezentată într-un sistem semilogaritmic de coordonate. S-a prezentat, pentru exemplificare, cazul a două animale, unul injectat cu gamma-globulină obținută cu etanol, iar celălalt cu preparatul obținut prin metoda cu sulfat de amoniu + DEAE-celuloză (fig. 2).

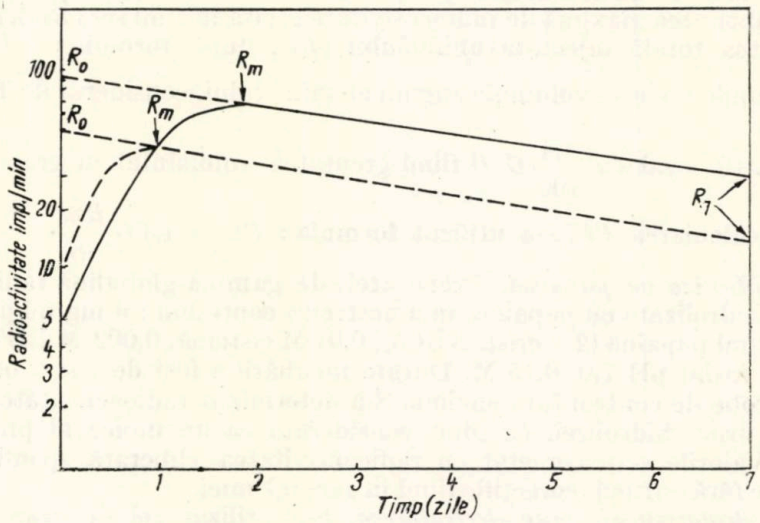


Fig. 2. — Variația radioactivității totale în serul animalelor
– – – animal injectat cu IgG precipitat cu etanol
——— animal injectat cu IgG precipitat cu sulfat de amoniu și cromatografiat pe DEAE-celuloză

Rezultatele medii obținute cu cele două loturi de animale, sînt prezentate în tabela 1.

Calculînd semnificația statistică a diferențelor, s-a observat că cele două preparate prezintă diferențe semnificative pentru *Vr*, *Rp*, și *PU*, dar nu și pentru $t^1/_2$ și P_7.

Tabela 1

Resorbția și persistența în singe a gamma-globulinei radioactive obținută prin precipitare cu etanol și prin precipitare cu sulfat de amoniu și cromatografie pe DEAE-celuloză

Preparatul obținut cu :	Viteza de resorbție (*Vr*) (ore)	Radioactivitatea legată (*Rp*) (%)	Procent de radioactivitate la 7 zile (P_7) (%)	Timpul de înjumătățire (*t* 1/2) (ore)	Procent de utilizare (*PU*) (%)
Etanol	28±3	67,3±5,1	29,3±3,2	123±5	22,5±1,9
Sulfat de amoniu + DEAE-celuloză	45±2	94,1±1,0	27,4±3,4	144±7	49,4±3,2

Radioactivitatea legată în ser este considerabil mai mică la preparatul obținut cu etanol, dar această deosebire între preparate tinde să se niveleze în primele 24 de ore de la administrarea gamma-globulinelor, așa cum de altfel se observă în figura 3. Au fost alese, pentru exemplificare, numai datele obținute pe două animale, celelalte fiind similare cu acestea.

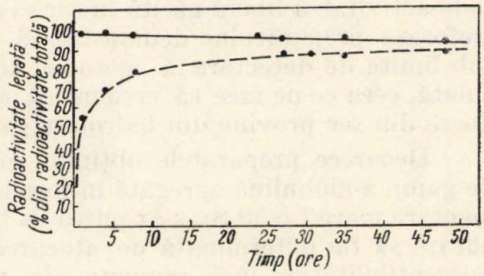


Fig. 3. — Variația % a radioactivității legate din ser
— — —etanol
——— sulfat de amoniu

Hidroliza cu papainã a celor două preparate a prezentat diferențe marcate, care au fost comparabile la ambele intervale de timp utilizate (tabela 2). De notat că trecerea peste DEAE-celuloză îndepărtează din

Tabela 2

Hidroliza cu papainã a preparatelor de gamma-globulinã radioactive obținute prin precipitare cu etanol și prin precipitare cu sulfat de amoniu sau cu etanol și cromatografie pe DEAE-celuloză

Preparatul obținut cu :	Radioactivitățile eliberate (% din radioactivitățile inițiale) la :	
	1 oră	5 ore
Etanol	20,2	32,6
Sulfat de amoniu + DEAE-celuloză	11,8	14,7
Etanol + DEAE-celuloză	9,6	12,9

preparatul cu etanol componente care par a fi responsabile de eliberarea marcată de radioactivitate.

DISCUȚII

Deosebirea dintre cele două preparate de gamma-globulină utilizate se manifestă atunci cînd se compară procentul lor de utilizare (*PU*) și radioactivitatea legată (*Rp*) (tabela 1). Ambele rezultate sugerează că la locul de inoculare se desfășoară un proces de „cenzură" proteinoclazică care afectează mai mult preparatul obținut prin precipitare cu etanol decît pe cel obținut prin precipitare cu sulfat de amoniu și cromatografie pe DEAE-celuloză. În consecință, va fi distrusă o cantitate mai mare din gamma-globulina obținută cu etanol, ceea ce face ca la o cantitate egală inoculată din cele două preparate, preparatul obținut cu sulfat de amoniu + DEAE-celuloză să realizeze concentrații de două ori mai ridicate în sînge. Așa cum era de așteptat, hidroliza locală a gamma-globulinei este mai intensă în primele 12 ore de la inoculare (fig. 3), pentru ca apoi să înceteze, probabil datorită epuizării componenților susceptibili de a fi degradați. Natura acestor componenți nu poate fi dedusă direct din experiențele noastre, însă faptul că preparatul de gamma-globulină obținut cu etanol posedă și alte proteine de balast (vezi fig. 1) nu exclude ca cel puțin o parte din radioactivitatea liberă găsită în ser să poată fi pusă pe socoteala lor. Electroforeza preparatului demonstrează aici că impuritățile trebuie să fie sub limita de detectare a metodei, adică cel mult 5% din proteina inoculată, ceea ce ne face să credem că cea mai mare parte a radioactivității libere din ser provine din hidroliza gamma-globulinei.

Deoarece preparatele obținute cu etanol conțin cantități sesizabile de gamma-globulină agregată în forme moleculare cu o constantă de sedimentare mare (>30 S), s-ar putea ca hidroliza mai avansată a acestor preparate să fie determinată de atacarea cu preferință a acestor agregate. Susceptibilitățile mai crescute ale preparatului obținut cu etanol la acțiunea papainei confirmă supoziția noastră, că hidroliza inegală a celor două preparate poate fi responsabilă de diferențele constatate. Trecerea peste DEAE-celuloză îndepărtează componenții „agregați" ai gamma-globulinei [12], de aceea reducerea efectului hidrolitic al papainei asupra gamma-globulinei preparate cu etanol și trecută pe DEAE-celuloză ar putea întări supoziția noastră că susceptibilitatea crescută a preparatului se datorește prezenței în el a acestor agregate de gamma-globulină.

Consecința directă a acestei debarasări locale a organismului de moleculele „alterate" prin metoda de obținere este aceea că în sînge pătrund numai molecule „cernute biologic", care trebuie să fie mai mult sau mai puțin asemănătoare, indiferent de produsul care s-a inoculat. De aceea, pare normal ca timpul de înjumătățire ($t^1/_2$) și radioactivitatea la 7 zile (P_7) a celor două preparate să nu prezinte deosebiri (tabela 1), deși timpul de înjumătățire, în cazul injectării intravenoase, a fost găsit diferit [8].

În sfîrșit, diferența constatată între viteza de resorbție (*Vr*) a celor două preparate arată că gamma-globulina obținută cu etanol se resoarbe mai repede (tabela 1), ceea ce pare greu de explicat. Fără a exclude că această comportare se datorește unei particularități fizico-chimice a moleculelor de gamma-globulină, imprimată de către metoda de obținere folosită, există posibilitatea ca una din impuritățile proteice ce însoțesc gamma-

globulina în preparatul cu etanol să acționeze ca un factor de mărire a difuzibilității, printr-o acțiune de tip hialuronidazic. Este de menționat că administrînd la două animale gamma-globulină preparată cu sulfat de amoniu + DEAE în asociație cu hialuronidază (5 — 10 mg/kg corp), s-a constatat o accelerare a vitezei de resorbție, maximul de radioactivitate fiind atins în ser la 30 de ore.

Rezultatele noastre atrag atenția asupra unui fapt trecut cu vederea de cei care recurg prea repede la administrarea gamma-globulinei în profilaxia unor boli infecțioase. Preparatele obținute cu etanol suferă o degradare certă la locul de inoculare, fenomen ce poate semnaliza o pătrundere a gamma-globulinelor în sistemul celulelor care prelucrează antigenele și care mediază răspunsul imun. În aceste condiții, gamma-globulinele pot „imuniza" organismul inoculat (mai ales în cazul tratamentelor repetate). Există riscul apariției anticorpilor capabili să reacționeze cu alotipurile gamma-globulinelor și să producă, în caz de graviditate, perturbări în sistemul de sinteză al gamma-globulinelor la fetus, printr-un mecanism asemănător cu cel prezent în imunocompatibilitate Rh.

Există, de asemenea, riscul apariției unor auto-anticorpi capabili să reacționeze cu gamma-globulinele proprii (vezi cazul homoreactantului pe iepure [13]). Prezența anticorpilor poate să fie riscantă, cu atît mai mult cu cît nu se cunosc efectele lor posibile asupra receptorului de tip gamma-globulină de pe suprafața celulelor imunocompetente.

Deoarece efectele hidrolitice au fost considerabil mai scăzute în cazul preparatelor obținute prin metoda cromatografiei pe DEAE-celuloză, se impune, ca o necesitate dictată de prudență, folosirea cu predilecție a unor astfel de preparate în terapia cu gamma-globuline la om.

Prezentat la redacție la 19 decembrie 1970

Laboratorul de imunochimie
Institutul de biochimie București

BIBLIOGRAFIE

1. W. L. Hughes, (în) H. Neurath și K. Bailey, *The Proteins*, Acad. Press, New York, **II**, 663 (1954).
2. R. B. Pennell, (în) F. W. Putnam, *The plasma proteins*. Acad. Press, New York, **I**, 6 (1960)..
3. T. Freeman, Clin. Chim. Acta, **4**, 788 (1959).
4. A. H. Gordon, Biochem. J., **66**, 255 (1962); **82**, 531 (1962).
5. V. Gheție, V. Micușan, *Analiza imunochimică*, Edit. Academiei R.S.R. București, 1966, pag. 223
6. J. L. Fahey, A. P. Horbett, J. Biol. Chem., **234**, 2645 (1959).
7. W. M. Hunter, F. C. Greenwood, Nature, **194**, 495 (1962).
8. S. Cohen, R. C. Holloway, C. Mathews, A. S. Mc Farlane, Biochem. J., **62**, 143 (1956
9. T. J. Gill, D. S. Papermaster, J. F. Mowbray, J. Immunol., **95**, 794 (1965).
10. S. Cohen, A. N. Gordon, C. Matthews, Biochem. J., **82**, 205 (1962).
11. V. Gheție, L. Buzilă, S. Mihăescu, St. cerc. biochim., **13**, 265 (1970).
12. J. L. Fahey, E. W. Terry, (în) D. M. Weir, *Handbook of Experimental Immunology*, Blackwell, Oxford, Edinburgh, 1967, pag. 19
13. W. J. Mandy, J. Immunol., **99**, 815 (1967).

RESORPTION AND PERSISTENCE WITHIN RABBIT CIRCULATION OF INTRAMUSCULARLY ADMINISTRERED GAMMA-GLOBULIN

SUMMARY

The resorption and persistence within blood of rabbit immunoglobulins obtained either by ethanol or ammonium sulfate precipitations followed by DEAE-cellulose chromatography were compared.

Intramuscularly injected gamma-globulin obtained with ethanol is destroyed at the local site in a higher proportion than that obtained by chromatography; thus, the last preparation assures a higher concentration of gamma-globulin within circulation. The circulation factors related to the utilization in immunoprophylaxis of gamma-globulin prepared by the two methods are discussed.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 2, 143–155 (1971)

CORELAȚII ÎNTRE UNELE GRUPE DE COMPONENTE CHIMICE ALE FRUCTELOR DE TOMATE

GEORGETA ENĂCHESCU și D. BUNESCU

Rezumat. La fructele a nouă soiuri de tomate raionate s-a studiat conținutul în principalele componente chimice importante din punct de vedere alimentar și tehnologic, formele predominante de acizi organici și aminoacizi liberi precum și corelațiile acestora.

Prin variabilitatea componentelor determinate soiurile cercetate s-au deosebit mai mult prin conținutul în acid ascorbic, pigmenți carotenoizi, acid malic și aminoacizi liberi ai fructelor.

Din totalul anionilor 40–60% este reprezentat prin acidul citric, iar circa 9% prin acidul malic. Cea mai mare parte a anionilor se găsesc sub formă legată. Soiurile s-au diferențiat mai mult prin proporția unor acizi față de alții decît prin aciditatea lor totală. Cantitatea de anioni totali a fost corelată invers cu gradul lor de salificare.

Conținutul în aminoacizi al tomatelor (dintre care au predominat acidul aspartic, alanina, acidul glutamic și gamaaminobutiric) este mai diferit între soiuri decît acela în proteină brută.

Între proporțiile de proteină brută și cenușă, proteină brută și pigmenți carotenoizi, anionii legați și acizii volatili, proteina brută și aminoacizii liberi s-au găsit corelații pozitive, iar între conținutul în proteină brută și zahăr, proteină brută și acid ascorbic, acid malic și acid citric, corelații inverse, unele semnificative, altele semnalate ca tendințe.

Aceste corelații permit relevarea unor noi aspecte ale metabolismului atît al grupelor de substanțe urmărite, cît și al speciei.

Caracterizarea compoziției chimice specifice soiurilor și liniilor unor specii vegetale cultivate, atît de utilă în lucrările de genetică și ameliorare, poate fi mereu adîncită, fie prin determinarea unor componente nestudiate încă, fie prin stabilirea raporturilor cantitative în care se acumulează componentele chimice, unele față de altele, la o stare de creștere și dezvoltare determinată.

Cunoașterea naturii componentelor chimice și a corelațiilor dintre acestea este importantă din punctul de vedere al biochimiei teoretice, pentru verificarea căilor metabolice cunoscute la alte organisme sau prin găsirea unor particularități ale acestora.

La tomate, printre grupele de substanțe urmărite în ultima vreme, datorită posibilităților de separare cromatografică, se numără aromele, pigmenții, aminoacizii și alți acizi organici etc. Cu privire la aminoacizii

liberi, s-au identificat reprezentații mai importanți [1], apoi s-a trecut la anumiți factori care influențează acumularea acestora, ca starea de maturare a fructelor și poziția lor pe plante [2] sau condițiile de mediu [3].

Acizii organici din tomate au fost studiați de asemenea ca prezență [4], [5], în dependență de starea de maturare a fructelor [6], de temperatură [7] sau ca o caracteristică a precocității soiurilor [8].

Literatura conține date puține în legătură cu diferențierea soiurilor de tomate prin natura acestor componente sau prin corelații între anumite grupe de componente.

În lucrări anterioare, referitoare la unele aspecte ale compoziției chimice a tomatelor și la unii factori care o influențează [9], precum și la variabilitatea ei [10], s-au constatat corelații între anumite componente chimice ale fructelor la maturitatea de consum.

În lucrarea de față s-au căutat noi posibilități de diferențiere a soiurilor de tomate, prin natura și cantitățile de aminoacizi liberi, acizi organici nevolatili predominanți, precum și prin corelațiile acestora cu alte componente chimice ale fructelor.

MATERIAL ȘI METODE

S-au urmărit fructele a 9 soiuri de tomate, din recolta 1967, cultivate la Institutul de cercetări pentru legumicultură și floricultură — Vidra — jud. Ilfov. Fructele au fost recoltate la maturitatea de consum, în perioada de producție maximă a plantelor. S-au analizat probe medii pe soi, alcătuite prin recoltarea a cîte un fruct de la 30 — 40 plante. Omogenatul unor porțiuni egale luate din toate fructele a servit la efectuarea determinărilor. S-a determinat conținutul în substanță uscată totală (105°C) și solubilă (refractometric zahăr total ca zahăr invertit), proteină brută (NX 6,25), cenușă, pigmenți carotenoizi totali, acid ascorbic, prin metode curente.

Acizii organici și aminoacizii s-au determinat din același extras, printr-o metodă expusă anterior [12]. Acizii organici au fost separați pe Dowex 1 × 2 — 50/100 în formă de acetat și identificați prin cromatografie pe hîrtie. Aminoacizii, separați pe hîrtie Schleicher & Schüll 2040 și fixați sub formă de complex cupric, după revelarea cu ninhidrină au fost apreciați colorimetric, folosind ca standard alanina.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În tabela 1 este prezentat conținutul fructelor din soiurile urmărite, în principalele componente chimice.

O primă caracterizare a soiurilor de tomate studiate se poate face pe baza greutății fructelor, care este mică și mijlocie (40—120 g) și a conținutului în substanță uscată solubilă, care prezintă o trecere treptată de la valoarea minimă 4,8% la cea maximă de 6,0%.

Ținînd seama de rezultatele obținute la soiuri similare în alți ani [9], prin conținutul lor mediu în substanță uscată solubilă de 5,4%, soiurile

Tabela 1

Conținutul în principalele componente chimice ale soiurilor de tomate

Soiurile	Greutate medie fruct %	Subst. uscată		Zahăr total	Proteină brută	Cenușă	Alcalinitatea cenușii m val/g cenușă	Acid ascorbic	Pigmenți carot.		*a)* Z. tot / s.u. tot.	*b)* Z. tot / s.u. sol.
		Totală	Solubilă						Totali ca licopen	Xantofile		
		Procente la substanța proaspătă						mg % g. subst. proaspătă				
1. Nr. 10 × Bizon	52,4	6,97	6,0	3,88	0,99	0,52	9,37	27,5	3,0	0,43	55,66	64,66
2. Sioux	86,3	6,49	5,9	3,84	1,12	0,59	10,06	22,6	5,4	0,31	59,16	65,08
3. Delicatess	56,6	6,84	5,8	3,79	1,05	0,48	10,39	27,5	3,2	0,43	55,40	65,34
4. Best of all	51,0	7,42	5,6	3,79	1,08	0,63	10,05	26,0	5,9	0,40	51,07	67,67
5. Red Top	51,3	6,19	5,4	3,19	1,22	0,66	7,20	15,7	4,7	0,33	51,53	59,07
6. Di Roma	40,2	7,09	5,5	3,39	1,37	0,56	11,12	19,6	4,9	0,37	47,81	61,63
7. Temnocrasnii	75,1	5,57	5,0	2,90	1,05	0,53	9,44	20,6	3,7	0,54	52,06	58,00
8. Krasnodareț	99,8	6,16	5,0	3,13	1,22	0,64	11,25	19,6	5,8	0,26	50,81	62,60
9. Gimar	119,9	6,26	4 8	3,25	0,94	0,52	10,61	22,6	3,4	0,21	51,91	67,70
Media	79,2	6,55	5,4	3,46	1,11	0,57	9,94	22,4	4,4	0,36	52,82	63,50
Amplitudinea de variație *c)*	100,6	28,2	22,2	28,3	38,7	31,5	40,7	52,6	65,9	91,6	21,4	13,7
S_x *d)*	26,82	—	0,43	0,36	0,133	0,06	—	4,01	—	—	—	—
Coeficientul de variație *e)*	33,86	—	7,96	10,40	12,97	10,52	—	17,89	—	—	—	—

a) = Conținutul în zahăr × 100 : subst. uscată 105°C (totală)

b) = ... solubilă

c) = Diferența între limita superioară și inferioară × 100 : medie

d) = Abaterea standard a unei determinări

e) = $\frac{S_x \times 100}{\text{medie}}$.

studiate în condiţiile climatice ale anului 1967 se clasează printre soiurile cu conţinut scăzut în această componentă.

Corelat cu substanţa uscată solubilă, conţinutul în zahăr şi acid ascorbic de asemenea este scăzut. Valori mai mari pentru aceste componente, inclusiv acidul ascorbic, s-au întîlnit la soiurile Nr. 10 × Bizon, Delicatess, Sioux iar mai mici la Gimar, Red Top şi Temnocrasnîi, fiind în general în corelaţie inversă cu greutatea fructelor.

Privitor la individualizarea soiurilor prin conţinutul în principalele componente chimice, amplitudinea de variaţie a valorilor respective arată că diferenţele cele mai mari între soiuri s-au întîlnit la conţinutul în acid ascorbic şi pigmenţi. O variabilitate mare a avut-o şi greutatea medie a fructelor.

Soiurile se deosebesc cel mai puţin prin conţinutul în substanţă uscată totală şi solubilă, prin conţinutul în zahăr, respectiv prin raportul dintre acest din urmă conţinut şi cel în substanţă uscată totală sau solubilă (Z tot/s.u.tot ; Z tot/s.u. sol.).

Această constanţă a proporţiei de zahăr în totalul substanţelor acumulate în tomate este explicabilă, ţinînd seama de rolul metabolic al formelor simple ale zaharurilor.

Privitor la corelaţia care poate exista între acumularea principalelor componente ale fructelor de tomate, în figura 1 se dă variaţia proporţiei acestor componente în substanţa uscată, la soiurile aşezate în ordinea creşterii conţinutului în substanţă uscată totală, iar în tabela 4 valoarea şi semnificaţia coeficienţilor de corelaţie.

Din figura 1 rezultă un paralelism între proporţia de zahăr total în substanţa uscată totală şi solubilă şi acumularea substanţei uscate, cu deosebirea că la soiurile cu conţinutul cel mai ridicat în substanţă uscată totală proporţia de zahăr este mai scăzută, ca şi cum zahărul n-ar trebui să depăşească o anumită proporţie, indiferent de cuantumul acumulării celorlalte substanţe.

Proporţia de acid ascorbic este în general mai mare la soiurile ale căror fructe conţin zahăr mai mult, dar proporţiile proteinei brute, cenuşii şi pigmenţilor totali se micşorează cu cît fructele sînt mai bogate în zahăr şi substanţă uscată, fapt constatat şi la compararea altor specii de legume [11].

Din figura 1 mai rezultă corelaţia pozitivă între proporţia de proteină brută şi cea de cenuşă, datorită desigur nu numai locului pe care-l ocupă unii cationi în structura proteinelor sau în activitatea enzimatică. Date fiind raporturile inverse între acumularea celor două componente de mai sus şi a zahărului, între proporţia proteinei brute sau a cenuşii şi proporţia de acid ascorbic la fructele soiurilor studiate există o corelaţie inversă.

Privitor la corelaţia inversă dintre acumularea substanţelor cu azot care în majoritate au la bază aminoacizi şi a acidului ascorbic, aceasta este mai uşor explicabilă, ţinînd seama că în condiţiile favorabile de acumulare a substanţelor cu azot, acumularea zaharurilor, precursori direcţi ai acidului ascorbic, este dezavantajată. Acest lucru, relevat ca fiind general la compararea diferitelor specii de legume [11], este posibil, dat fiind că prin acidul piruvic sau alţi cetoacizi se poate realiza o balanţă între sinteza aminoacizilor şi aceea a zaharurilor.

Tendința unei corelații negative există de asemenea și între proporția de pigmenți carotenoizi și proteina brută, relevată în altă lucrare [10] și inexplicabilă după cunoștințele actuale asupra biosintezei carotenilor.

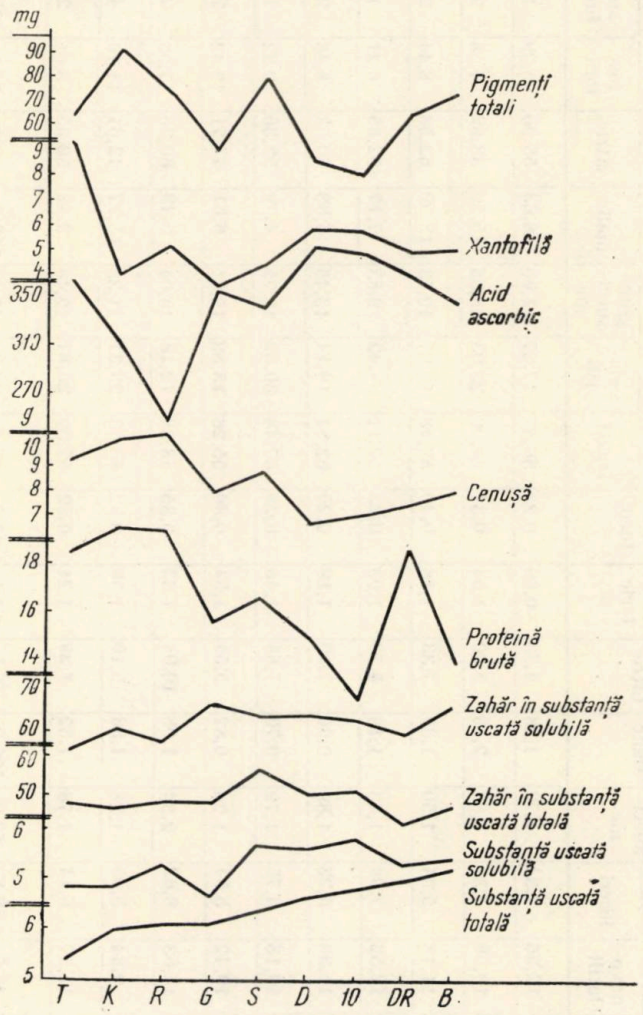


Fig. 1. — Corelații între proporțiile unor componente chimice ale tomatelor (în procente la substanța uscată totală).
T = Temnokrasnii; *K* = Krasnodareț; *R* = Red top; *G* = Gimar; *S* = Sioux; *D* = Delicatess; 10 = Nr. 10 × Bizon; *DR* = Di Roma; *B* = Best of all.

În tabela 2 este prezentat conținutul în acizii predominanți ai fructelor din soiurile de tomate analizate, precum și proporția acestora față de totalul anionilor.

Datele din tabela 2 relevă, mai întîi, faptul cunoscut că aciditatea tomatelor are la bază acidul citric, care reprezintă la soiurile studiate 40—60% din totalul anionilor liberi și legați, fiind urmat de grupa acidului

Tabela 2

Conținutul unor soiuri de tomate în acizi organici nevolatili predominanți

În m. val. % g. substanță proaspătă

Soiul	Acizi			Grupă succinic	Malic	Citric	Fosforic	Sulfuric	% din acizi totali							Malic ×100
	totali	nevolatili	liberi						legați	volatili	grupă succinic	malic	citric	fosforic	sulfuric	citric
1. Nr. 10 × Bizon	14,82	12,26	7,34	1,72	1,28	8,73	0,80	0,25	50,47	17,27	11,60	8,63	58,90	5,39	1,68	14,66
2. Delicatess	13,72	10,56	4,39	1,83	2,10	5,30	1,04	0,31	64,06	23,03	13,33	15,50	38,62	7,58	2,26	39,62
3. Best of all.	13,97	11,18	5,94	1,50	1,89	7,33	1,18	0,40	57,48	19,97	10,73	13,50	52,58	8,44	2,86	25,78
4. Temnocrasnîi.	16,58	12,53	7,94	1,63	1,19	8,73	1,03	0,23	52,11	24,42	9,83	7,17	52,65	6,21	1,38	13,63
5. Sioux	14,05	11,36	5,22	1,89	0,96	7,10	1,19	0,29	62,84	19,14	13,45	6,83	50,53	8,46	2,06	13,52
6. Di Roma	14,61	10,18	4,75	1,79	0,70	7,65	1,45	0,29	67,48	30,32	12,25	4,79	52,36	9,92	1,98	9,15
7. Red Top	12,39	10,42	5,54	1,96	0,82	5,54	1,54	0,30	55,28	15,89	15,81	6,61	44,71	12,42	2,42	14,80
8. Krasnodareț	16,66	14,63	8,62	2,34	1,08	10,04	1,33	0,35	48,28	12,18	14,04	6,48	60,26	7,98	2,10	10,75
9. Gimar	12,18	9,34	5,05	1,38	1,86	5,19	1,36	0,52	58,53	23,31	11,33	15,27	42,61	11,16	4,26	35,83
Media	14,33	11,37	6,14	1,78	1,32	7,29	1,21	0,32	57,39	20,61	12,48	9,42	50,35	8,61	2,33	19,75
c) Amplitudinea de variație	31,2	46,5	62,8	53,9	106,0	66,5	61,1	90,6	33,4	88,0	47,9	113,7	42,9	70,0	123,6	154,3
d) $S_{\bar{x}}$	1,59	—	1,44	—	0,52	1,70	—	—	—	—	—	4,15	7,29	—	—	—
e) Coeficient de variație	11,09	—	23,45	—	39,47	23,31						44,05	14,47			

c) *d*) *e*) = ca la tabela 1.

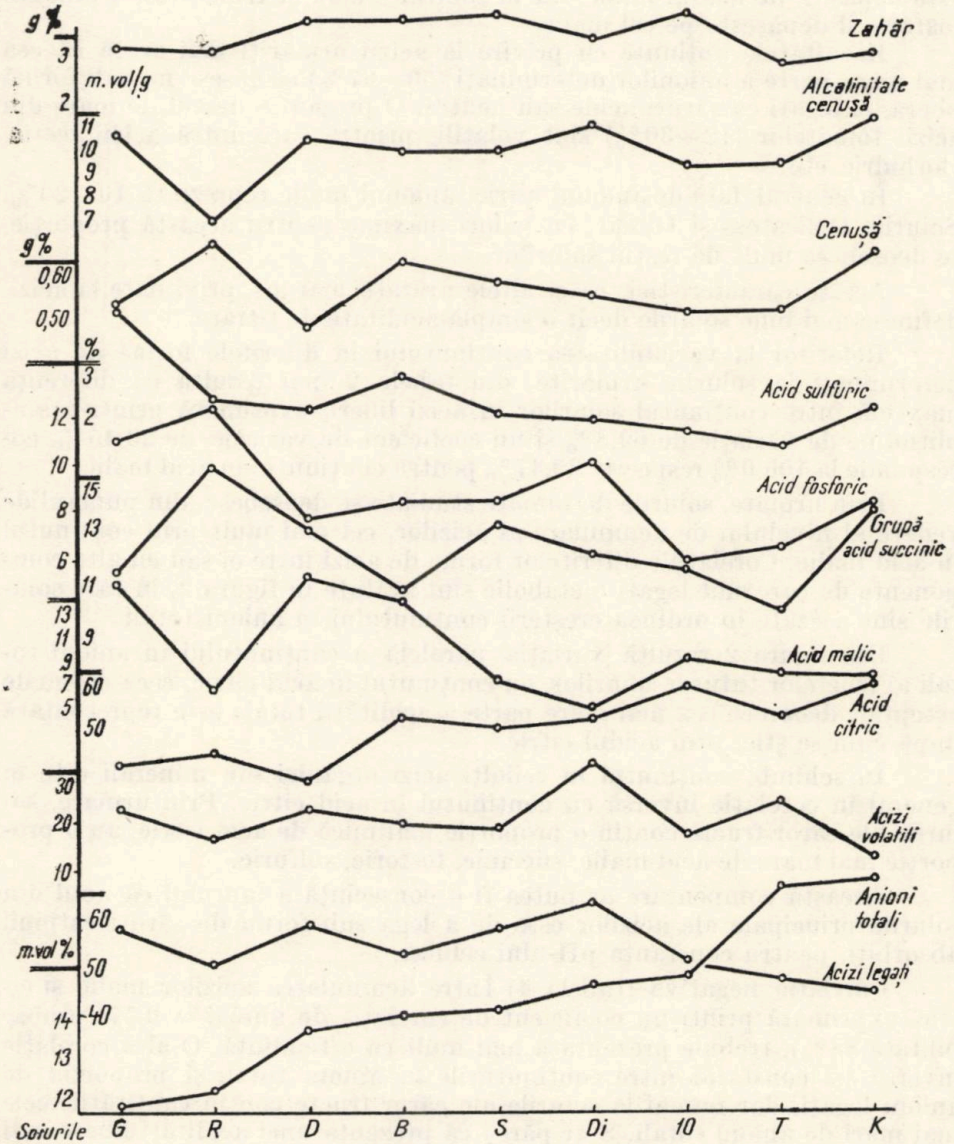


Fig. 2. — Corelații între proporțiile de acizi organici nevolatili ai soiurilor de tomate.
G = Gimar; *R* = Red top; *D* = Delicatess; *B* = Best of all; *S* = Sioux; *Di* = Di Roma; *10* = Nr. 10 × Bizon; *T* = Temnokrasnii; *K* = Krasnodareț.

succinic, în care intră şi acidul chinic, acidul gliceric, apoi de acidul malic şi de acizii anorganici, fosforic şi sulfuric.

La soiuri ca Delicatess, Best of all şi Gimar, grupa acidului succinic este depăşită de acidul malic, iar la soiurile Sioux şi Krasnodareţ anionul fosforic îl depăşeşte pe cel malic.

Rezultatele obţinute cu privire la acizii urmăriţi mai arată că cea mai mare parte a anionilor determinaţi (50—67%) se găsesc nu sub formă liberă, ci legaţi ca săruri acide sau neutre. O proporţie destul de mare din acizii tomatelor (12—30%) sînt volatili, printre care intră acizii acetic, clorhidric etc.

În general, faţă de anionul citric, anionul malic reprezintă 10—20%. Soiurile Delicatess şi Gimar, cu valori maxime pentru această proporţie, se deosebesc mult de restul soiurilor.

Aceste caracteristici, ca şi altele arătate mai jos, privitoare la acizi, definesc mai bine soiurile decît o simplă aciditate de titrare.

Referitor la variabilitatea conţinutului în diferitele forme de acizi determinaţi la soiurile urmărite, din tabela 2 mai rezultă că diferenţa maximă între conţinutul soiurilor în acizi liberi, exprimată printr-o amplitudine de variaţie de 62,8% şi un coeficient de variaţie de 23,45%, corespunde la 106,0% respectiv 39,47% pentru conţinutul în acid malic.

Prin urmare, soiurile de tomate studiate se deosebesc, din punctul de vedere al nivelului de acumulare al acizilor, cel mai mult prin conţinutul în acid malic. Corelaţiile diferitelor forme de acizi între ei sau cu alte componente de care sînt legaţi metabolic sînt arătate în figura 2, în care soiurile sînt aşezate în ordinea creşterii conţinutului în anioni totali.

Din figura 2 rezultă variaţia paralelă a conţinutului în anioni totali al fructelor tuturor soiurilor, cu conţinutul în acid citric, ceea ce era de aşteptat, deoarece cea mai mare parte a acidităţii totale este reprezentată după cum se ştie, prin acidul citric.

În schimb, conţinutul în ceilalţi acizi organici sau minerali este în general în corelaţie inversă cu conţinutul în acid citric. Prin urmare, soiurile ale căror fructe conţin o proporţie mai mică de acid citric, au o proporţie mai mare de acid malic, succinic, fosforic, sulfuric.

Această compensare ar putea fi o consecinţă a faptului că unul din rolurile principale ale acizilor este de a lega sub formă de săruri cationii absorbiţi, pentru constanţa pH-ului celular.

Corelaţia negativă (tabela 4) între acumularea acizilor malic şi citric, exprimată printr-un coeficient de corelaţie de numai — 0,57 (probabilitate 88%), trebuie prezentată mai mult ca o tendinţă. O altă corelaţie inversă s-a constatat între conţinuturile în anioni totali şi proporţia de anioni legaţi, dar numai la soiurile ale căror fructe conţin cantităţile cele mai mari de anioni totali. S-ar părea că prezenţa unei acidităţi libere mai mari nu determină absorbţia mai puternică a cationilor, care să ducă la un grad de salificare similar cu acela întîlnit la fructele cu cantităţi mai mici de anioni. Limitele între care poate să varieze aciditatea liberă a tomatelor sînt probabil destul de mari. S-a observat, de asemenea, corelaţia directă între acumularea acizilor volatili şi proporţia de salificare a anionilor, reprezentată prin coeficientul de corelaţie + 0,71, care este semnificativ.

Tabela 3

Aminoacizii liberi predominanți din soiurile de tomate

mg % g substanță proaspătă

Soiurile	Leucina	Fenil alanină	Valină	Acid gama-amino-butiric	Prolină	Alanină	Acid glutamic	Acid aspartic	Glutamină	Asparagină + arginină	Lizină
1. Di Roma	10,5	5,2	5,2	168,4	4,2	31,5	210,5	63,1	10,5	10,5	5,2
2. Red Top	8,8	4,4	4,4	140,3	3,5	26,3	175,4	52,6	8,7	8,7	4,4
3. Krasnodareț	5,3	4,2	4,2	106,3	2,1	21,0	170,2	42,5	5,3	10,6	5,3
4. Nr. 10 × Bizon	9,2	5,5	2,1	133,3	4,4	16,6	133,3	33,3	9,2	5,5	9,2
5. Temnocrasnîi	5,1	4,0	4,0	122,4	1,0	15,3	163,2	40,8	5,1	5,1	4,0
6. Delicatess	4,2	5,3	2,1	106,3	1,0	15,9	127,6	31,9	4,2	4,2	4,2
7. Sioux	4,4	2,2	2,2	108,7	1,0	32,6	108,7	43,8	4,4	5,4	4,4
8. Best of all	2,5	1,2	1,2	80,0	1,2	25,0	100,0	25,0	2,5	2,5	2,5
9. Gimar	1,7	1,7	1,7	90,0	1,7	4,4	70,2	35,0	urme	0,7	0,8
Media	5,7	3,7	3,0	100,3	2,1	20,9	139,9	40,9	5,5	6,0	4,4
Amplitudinea de variație *)	—	—	—	88,1	—	129,6	100,2	93,1	—	—	—

*) = Ca la tabela 1.

Între proporţia de anioni legaţi şi alcalinitatea cenuşii există tendinţa unei corelări pozitive, aşa cum era de aşteptat.

Acumularea componentelor minerale (cenuşă) în fructe nu pare a avea o legătură cu acumularea vreunuia din categoriile de acizi determinaţi.

În ceea ce priveşte conţinutul de zahăr acesta a avut valorile cele mai scăzute atît la soiurile cu aciditatea cea mai mare cît şi la cele cu aciditatea cea mai mică.

Conţinutul în aminoacizi liberi predominanţi ai fructelor din soiurile de tomate studiate este prezentat în tabela 3. După cum se ştie, în tomate, aşa cum rezultă şi din datele acestui tabel, predomină acidul glutamic, acidul gamaaminobutiric (produs de decarboxilare care apare în metabolismul de degradare a acidului glutamic), acidul aspartic şi alanina. Soiurile de tomate se deosebesc destul de mult între ele nu prin prezenţa sau absenţa aminoacizilor predominanţi, ci prin nivelul lor de acumulare. Fructele soiurilor Di Roma şi Red Top conţin cele mai mari cantităţi, iar fructele soiurilor Best of all şi Gimar cele mai mici din principalii aminoacizi.

Examinînd amplitudinea de variaţie a conţinutului în aminoacizi la cele 9 soiuri de tomate studiate (80,1—129,6), apare o diferenţă destul de mare între soiuri, comparabilă numai cu cea întîlnită la conţinutul în acid malic (amplitudinea de variaţie 106).

Acest fapt arată posibilitatea ca soiurile de tomate să fie mai distinct diferenţiate prin conţinutul în aminoacizi liberi, decît prin conţinutul în azot total, respectiv proteină brută, al fructelor, a cărui amplitudine de variaţie este de numai 38,7 (tabela 1).

În figura 3 se arată variaţia conţinutului în aminoacizi în fructele soiurilor de tomate aşezate în ordinea creşterii procentului de proteină brută. Din fig. 3 rezultă că, în general, conţinutul în aminoacizi liberi predominanţi variază paralel cu acela în proteină brută. Prin urmare, soiurile cu conţinut ridicat în proteină brută (azot total) conţin şi cantităţi mai mari de aminoacizi liberi.

Soiul Krasnodareţ, dintre soiurile ale căror fructe conţin multă proteină brută, şi soiul Nr. 10 × Bizon, sărac în proteină brută, fac excepţie.

Tabela 4

Coeficienţii de corelaţie (r) între proporţiile unor componente chimice ale tomatelor

Componente corelate prin nouă perechi de valori	r	r_s *)	P **) (5%)
1. Proteină brută — cenuşă	+0,72	+0,67	96,9
2. Proteină brută-pigmenţi carotenoizi	+0,62	+0,59	92,6
3. Proteină brută — acid ascorbic	−0,74	−0,70	97,7
4. Proteină brută — zahăr	−0,55	−0,38	86,8
5. Acizi legaţi — acizi volatili	+0,71	+0,64	96,9
6. Acid malic — acid citric	−0,57	−0,33	88,5
7. Acizi legaţi-alcalinitate cenuşă	+0,26	+0,40	49,4
8. Acid glutamic — zahăr	−0,44	−0,25	76,5

*) Calculul după Spearman [13] [14]

**) P = probabilitate.

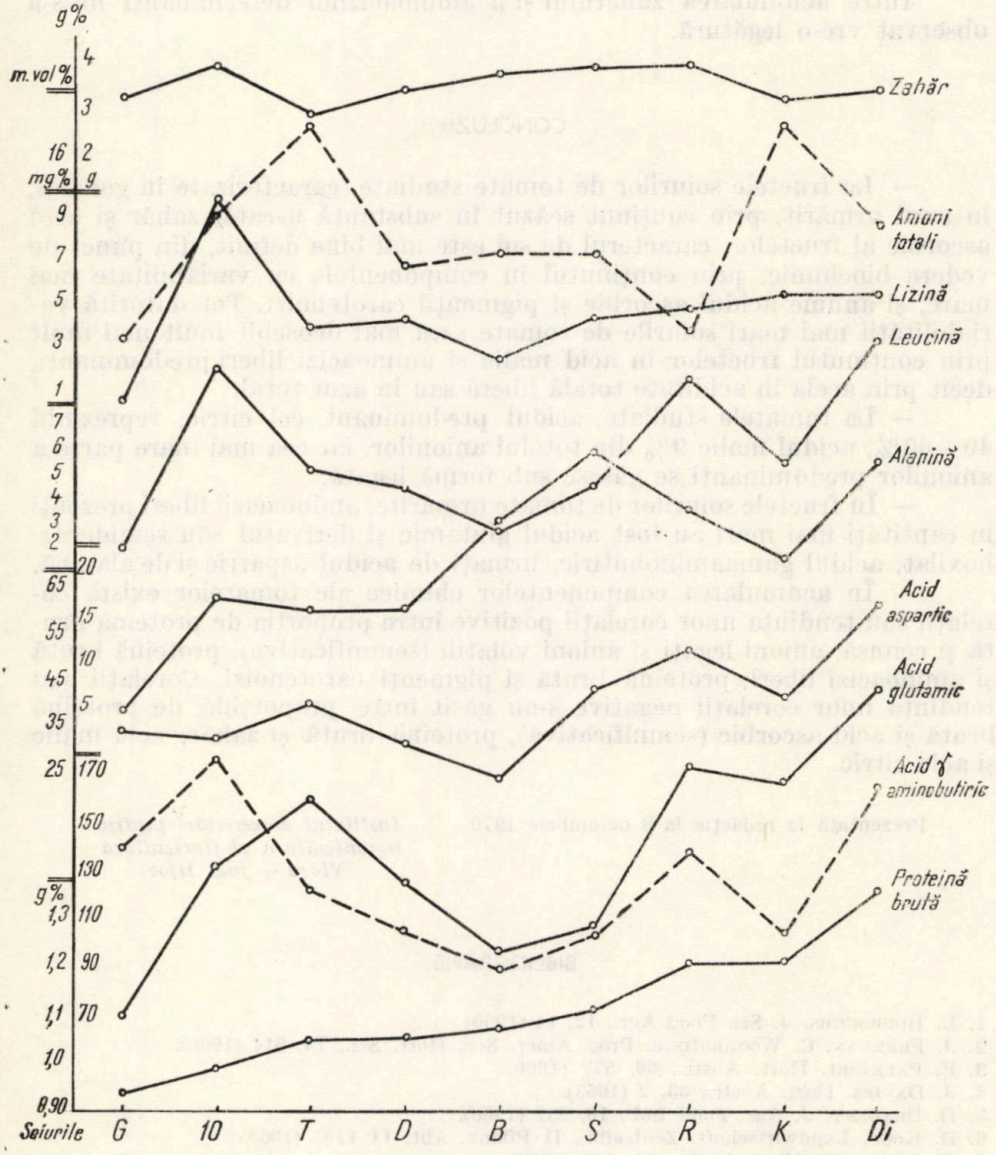


Fig. 3. — Corelații între conținuturile în aminoacizi predominanți liberi ai tomatelor.

G = Gimar; *R* = Red top; *D* = Delicatess; *B* = Best of all; *S* = Sioux; *Di* = Di Roma; 10 = Nr. 10 × Bizon; *T* = Temnokrasnîi; *K* = Krasnodareț.

Tot din figura 3 mai rezultă că, în afara soiurilor Temnocrasnîi şi Red Top, între conţinutul în anioni totali şi cel de aminoacizi liberi există o corelare pozitivă.

Între acumularea zahărului şi a aminoacizilor determinanţi nu s-a observat vre-o legătură.

CONCLUZII

— La fructele soiurilor de tomate studiate, caracterizate în general, în anul urmărit, prin conţinut scăzut în substanţă uscată, zahăr şi acid ascorbic al fructelor, caracterul de soi este mai bine definit, din punct de vedere biochimic, prin conţinutul în componentele cu variabilitate mai mare, şi anume acidul ascorbic şi pigmenţii carotenoizi. Tot datorită variabilităţii mai mari soiurile de tomate s-au mai deosebit mult mai mult prin conţinutul fructelor în acid malic şi aminoacizi liberi predominanţi, decît prin acela în aciditate totală liberă sau în azot total.

— La tomatele studiate, acidul predominant, cel citric, reprezintă 40—60%, acidul malic 9% din totalul anionilor, iar cea mai mare parte a anionilor predominanţi se găsesc sub formă legată.

— În fructele soiurilor de tomate urmărite, aminoacizii liberi prezenţi în cantităţi mai mari au fost acidul glutamic şi derivatul său semidecarboxilat, acidul gamaaminobutiric, urmaţi de acidul aspartic şi de alanină.

— În acumularea componentelor chimice ale tomatelor există corelaţii sau tendinţa unor corelaţii pozitive între proporţia de proteină brută şi cenuşă, anioni legaţi şi anioni volatili (semnificative), proteină brută şi aminoacizi liberi, proteină brută şi pigmenţi carotenoizi. Corelaţii sau tendinţa unor corelaţii negative s-au găsit între proporţiile de proteină brută şi acid ascorbic (semnificativă), proteină brută şi zahăr, acid malic şi acid citric.

Prezentată la redacţie la 8 octombrie 1970

Institutul de cercetări pentru legumicultură şi floricultură Vidra — jud. Ilfov

BIBLIOGRAFIE

1. L. Burroughs, J. Sci. Food Agr., **12**, 14 (1960).
2. J. Freeman, C. Woodbridge, Proc. Amer. Soc. Hort. Sci., **75**, 514 (1960).
3. F. Palmieri, Hort. Abstr., **36**, 577 (1966).
4. J. Davies, Hort. Abstr., **33**, 2 (1963).
5. D. Bradley, J. Agr. Food Ind., **16**, 232 (1960).
6. B. Koch, Landwirtschaft. Zentralbl., **II** Pflanz. Abt. **11** 1191 (1966).
7. E. Anderson, Hort. Abstr., **29**, 101 (1959).
8. B. Koch, Hort. Abstr., **32**, 637 (1962).
9. G. Enăchescu, R. Marinescu, Lucr. ştiinţifice ICHV, **V** (1961—1963).
10. G. Enăchescu, Lucr. ştiinţifice ICHV, **V** (1961—1963).
11. G. Enăchescu, Lucr. ştiinţifice ICHV, **VI** (1962—1963).
12. G. Enăchescu, Buletin ştiinţific, Univ. Craiova (sub tipar).
13. H. Arkin, K. Colton, *Statistical Methods*, Barnes et Noble Inc. New York, 1956.
14. N. Ceapoiu, *Metode statistice aplicate în experienţele agricole şi biologice*, Ed. agrosilvică, Bucureşti, 1968.

CORRELATIONS OF SOME TOMATO CHEMICAL COMPOUND GROUPS

SUMMARY

The content in the main chemical compounds, important from the nutritional and technological point of view, the prevailing forms of organic acids and free amino acids as well as their correlations have been studied in nine tomato varieties.

Due to the compound variability, the tomato varieties under consideration differed mainly in their ascorbic acid level, carotenoid pigments, malic acid and free amino acids of the fruit.

Out of the total anions, 40—60 per cent is represented by citric acid, and about 9 per cent by malic acid. Most anions are to be found under a bound form. Tomato varieties differed more in the rate of certain acids as compared to others, than in their total acidity. The amount of total anions has been inversely correlated to their salt rate.

The amount of free amino acids, among which glutamic, gamma-aminobutyric, aspartic acids and alanine are predominating, is more different than the amount of crude protein.

Positive correlations have been found between crude protein and ash ratios, crude protein and carotenoid pigments, bound anions and volatile acids, crude protein and free amino acids; inverse correlations have been found between the amount of crude protein and sugar, crude protein and ascorbic acid, malic and citric acid, some being significant others noticed only as a tendency.

These correlations point to the new metabolic aspects of the investigated compounds as well as of the species.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 2, 157–161 (1971)

CONȚINUTUL ÎN PENTOZE ȘI FOSFOR „ACIDOSOLUBIL" AL PLĂMÎNILOR ÎN SILICOZA EXPERIMENTALĂ LA ȘOBOLAN

T. FRITS, SILVIA GABOR și ZOE ANCA *)

Rezumat. S-a determinat concentrația pentozelor pulmonare „acidosolubile" și a fosforului „acidosolubil" la un lot de 19 șobolani silicozați, de 9 luni, precum și la un lot de 28 animale martor.

1. Determinările au interesat concentrația globală a pentozelor cît și concentrația fracțiunilor *a*) precipitabile cu Ba Cl_2, *b*) precipitabile cu $BaCl_2$ + alcool, *c*) neprecipitabile cu $BaCl_2$, constatîndu-se că în silicoză concentrația globală a pentozelor pulmonare este mai scăzută, în comparație cu cea găsită la martor (1,83 mg%, respectiv 2,76 mg%); proporțiile relative între cele trei fracțiuni sînt schimbate în silicoză în sensul creșterii fracțiunii neprecipitabile și scăderii fracțiunii precipitabile cu clorură de bariu + alcool.

2. Concentrația fosforului organic „acidosolubil" prezintă o creștere semnificativă în silicoză în comparație cu cea a martorilor, în schimb, fosforul mineral nu prezintă decît o creștere mică.

Fiind o cale activă în plămîni, ciclul pentozofosforic are o cotă parte importantă în metabolismul glucidic al acestui organ [1]—[4]. Făcînd abstracție de faptul că această cale constituie o sursă energetică însemnată, importanța sa rezidă îndeosebi în faptul că reprezintă principala sursă de $NADPH_2$ și de pentoze. Ca generatoare de hidrogen și de $NADPH_2$, ia parte la sinteza acizilor grași, a fosfolipidelor și a surfactantului alveolar. Se cunoaște că metabolismul lipidic pulmonar prezintă abateri în silicoză [5]. Pe de altă parte, calea pentozofosforică ca generatoare de pentoze, ia parte în sinteza nucleotizilor și a acizilor nucleici, al căror metabolism este de asemenea alterat în silicoză [6] — [9].

Plecînd de la considerațiile de mai sus și ținînd cont de interesul problemei, ne-am propus să urmărim conținutul plămînilor în pentoze „acidosolubile" și fosfor „acidosolubil", precum și activitatea glucozo — 6 — fosfat-dehidrogenazei în silicoză; pentru a obține unele detalii și asupra modului de desfășurare a etapelor intermediare ale ciclului pentozofosforic au fost efectuate și determinări pe fracțiuni de pentoze și de fosfor.

*) Colaborator tehnic Aurelia Coașan

METODA

Am lucrat pe plămîni prelevaţi de la şobolani (în greutate corporală de 220—240 g) cărora li s-a reprodus silicoza prin instilare intratraheală unică a 50 mg de cuarţ (conţinînd 99% bioxid de siliciu liber; mărimea particulelor: 2—5 microni). La 8—9 luni după instilare, interval de timp considerat suficient pentru dezvoltarea silicozei experimentale, animalele au fost sacrificate. După spălarea vaselor de sînge, plămînii au fost omogenizaţi (Potter). Determinările au fost făcute pe material mixt, rezultat din unirea a 3—4 plămîni, pentru a avea o cantitate de 4—5 g. Dozarea pentozelor s-a făcut cu ajutorul metodei descrise de S. Gheţie şi A. Cioba [10], iar citirea rezultatelor la spectrofotometru; pentru etalon s-a folosit d-riboză. Rezultatele obţinute au fost raportate de 100 g plămîn umed.

Dozările au interesat pentozele „acidosolubile" obţinute prin deproteinizarea omogenatului pulmonar cu acid tricloracetic (5%), din care au fost separate, prin precipitări succesive cu clorură de bariu, trei fracţiuni: fracţiunea precipitabilă cu Ba (I); fracţiunea neprecipitabilă cu Ba, dar precipitabilă cu Ba plus alcool 4 volume (II); fracţiunea neprecipitabilă (III), fracţionările făcîndu-se după tehnica recomandată de E. Biro [11]. Pe aceleaşi eşantioane s-a dozat şi fosforul, şi anume: fosforul „acidosolubil" total, fosforul organic „acidosolubil" şi fosforul mineral [11]. Dozările de P au fost făcute cu metoda lui Bell, Doisy şi Briggs [12], iar valorile le-am exprimat în mg P la 100 g plămîn umed.

Activitatea glucozo-6-fosfat-dehidrogenazei a fost urmărită cu ajutorul metodei lui D. Scheuch şi H. Kutscher [13].

REZULTATE

În tabela 1 sînt redate valorile concentraţiei pentozelor pulmonare „acidosolubile" la lotul de animale silicotice (19 şobolani) şi la lotul martor (28 şobolani). Valorile medii reprezintă valorile rezultate din determinările făcute pe cîte şapte probe mixte (omogenate mixte obţinute din cîte 3—4 plămîni). Din aceste date reies următoarele:

a) Concentraţia pentozelor pulmonare este semnificativ mai coborîtă la lotul silicotic, în comparaţie cu valoarea găsită la martori ($p < 0{,}01$).

b) Proporţiile relative ale celor trei fracţiuni de pentoze sînt modificate în silicoză: la lotul silicotic raporturile cantitative respectitve sînt 1 : 1,05 : 3,14 faţă de 1 : 1,37 : 2,40 la lotul martor.

c) În rezumat, în silicoză metabolismul pentozelor pulmonare prezintă modificări faţă de cel normal, atît sub raport cantitativ (scăderea globală a pentozelor tisulare pulmonare) cît şi sub raport calitativ (modificarea repartiţiei pe fracţiuni).

În ceea ce priveşte conţinutul în fosfor „acidosolubil", în tabela 2 sînt trecute valorile medii rezultate din determinările făcute pe 6 probe mixte (omogenate mixte obţinute prin unirea a cîte 3—4 plămîni).

Aceste date relevă următoarele:

a) Fosforul „acidosolubil" total prezintă o creştere semnificativă ($p < 0{,}01$) la lotul silicotic, ceea ce concordă cu rezultatele lui A. Kinny şi H. J. Einbrodt [14].

Tabela 1

Conținutul plăminilor în pentoze „acidosolubile" la șobolan (mg %)

	Fracțiunea I-a		Fracțiunea II-a		Fracțiunea III-a		Pentoze total	
	mg%	Semnificația statistică (*t*) față de martor	mg%	Semnificația statistică (*t*) față de martor	mg%	Semnificația statistică (*t*) față de martor	mg%	Semnificația statistică (*t*) față de martor
Martor (28)	0,59±0,08	—	0,81±0,08	—	1,42±0,05	—	2,76±0,15	—
Silicoză (19)	0,35±0,05	3,00 **	0,37±0,08	6,47 **	1,10±0,10	5,24 ***	1,83±0,14	4,65 ***

± – ES
** – $0,02 > p > 0,01$
*** – $p < 0,01$
( ) – număr de animale.

Tabela 2

Conținutul plăminilor în fosfor „acidosolubil" la șobolan (mg %)

Lot de animale	Fosfor total „acidosolubil"			Fosfor organic „acidosolubil"			Fosfor mineral			Grad de fosforilare		
	mg%	Semnificația statistică față de martor		mg%	Semnificația statistică față de martor		mg%	Semnificația statistică față de martor		(P-organic + P-mineral) : (P-mineral)	Semnificația statistică față de martor	
		t	*U*		*t*	*U*		*t*	*U*		*t*	*U*
Martor (28)	32,4±4,3	—	—	24,1±2,5	—	—	8,36±1,07	—	—	4,2 ±0,54	—	—
Silicoză (19)	51,46±5,85	3,5***	0,004	35,3 ±3,2	3,2***	0,009	11,24±0,7	1,8*	0,041	4,17±0,20	0,07*	0,33*

( ) – număr animale
± – ES
* – fără semnificație
*** – $p < 0,01$
t – testul „t"
U – testul „U" după Mann și Whitney

b) Concentrația fosforului organic acidosolubil prezintă o creștere semnificativă în silicoză ($p<0,01$).

c) Concentrația fosforului mineral este moderat crescută în plămînii silicotici, față de valoarea normală. Deși diferența dintre valorile medii ale celor două loturi este evidentă, testul „t" nu o confirmă ca semnificativă, ca urmare a dispersiei valorilor individuale la lotul martor; în schimb, testul „U" pentru serii de probe independente, după Mann și Whitney [15], relevă o diferență între cele două șiruri de valori.

d) Gradul de fosforilare, calculat după formula (P organic + P mineral) : (P mineral), este același la ambele loturi.

e) După Raikhlin și Sneidman [8], activitatea glucozo-6-fosfat-dehidrogenazei, studiată cu ajutorul metodei histochimice, ar fi mai scăzută în plămînii silicotici. Spre deosebire de acest rezultat, determinările noastre nu au relevat vreo diferență semnificativă între activitatea acestei enzime la lotul silicotic, față de lotul sănătos.

DISCUȚII

Este cunoascut că concentrația tisulară a substanțelor este rezultanta echilibrului dintre aport și eliminare. În cazul pentozelor, acestea provin din două surse de aport : ciclul petozofosforic și calea glicuronică. În ceea ce privește celălalt termen al echilibrului — eliminarea, aceasta se realizează fie prin utilizarea pentozelor formate la nivelul țesuturilor pentru sinteza nucleotizilor și a acizilor nucleici, fie prin metabolizarea lor. În lumina acestor considerații și pe baza rezultatelor obținute, se poate conchide că scăderea concentrației pentozelor tisulare pulmonare, constatată în silicoză, relevă modificarea echilibrului normal dintre aport și eliminare.

Legat de acestă constatare cu caracter general și ținînd cont de faptul că activitatea glucozo-6-fosfat-dehidrogenazei nu este alterată în silicoză, se poate conchide că scăderea concentrației pentozelor pulmonare („acidosolubile") în silicoză nu se datorește scăderii ritmului proceselor enzimatice la nivelul acestei trepte a ciclului pentozofosforic. Referitor la celelalte trepte ale ciclului, precum rezultă din datele relatate mai sus,pe lîngă scăderea concentrației globale a pentozelor pulmonare s-au mai înregistrat și unele modificări calitative, constînd din modificarea proporțiilor relative ale celor trei fracțiuni de pentoze. Această abatere relevă existența unor perturbări în sînul lanțurilor de reacții ale ciclului pentozofosforic, acestea putînd fi cauza unei scăderi de aport pentozic. Pe de altă parte, semnalat fiind că în silicoză are loc o intensificare a metabolismului ARN și DNA, concomitent cu scăderea concentrației acestora în țesutul pulmonar [6], [8], se poate admite că scăderea concentrației pentozelor pulmonare în silicoză rezultă și dintr-un consum mărit de pentoze căruia aportul de pentoze să nu-i poată face față.

CONCLUZII

În silicoză, alături de tulburările metabolice cunoscute ale glucidelor interesînd calea Emden — Meyerhof, ciclul lui Krebs, calea mucopolizaharidelor, se înregistrează și unele modificări ale metabolismului in-

termediar al pentozelor pulmonare. Aceste modificări se manifestă prin scăderea concentrației tisulare a pentozelor „acidosolubile" și modificarea proporțiilor relative între fracțiunile studiate, în sensul creșterii fracțiunii neprecipitabile și scăderii proporției fracțiunii precipitabile cu clorură de bariu + alcool. În ceea ce privește concentrația fosforului organic „acidosolubil", aceasta prezintă o creștere în silicoză.

Prezentată la redacție la 24 martie 1970

Institutul de sănătate publică și cercetări medicale, Cluj

BIBLIOGRAFIE

1. S. Buckingham, O. Heinemann, S. C. Sommers, Am. J. Pathology, **48**, 1027 (1966).
2. I. M. Felts, Med. Thorac, **22**, 89 (1965).
3. L. Heilmeyer, *Lehrbuch der Speziellen Pathologie*, G. Fischer Stuttgart (1968).
4. W. S. Tyler, A. G. E. Pearse, Thorax, **20**, 149 (1965).
5. S. Gabor, T. Frits, Z. Anca, Arch, Mal. Prof., **30**, 413 (1969).
6. F. M. Engelbrecht, S. C. Burger, Rez. in Bull. of. Hyg., **42**, 375 (1967).
7. G. Giles, Rez. în Ref, J. 30 F Seria Biol. Himia, **16**, 1378 (1967).
8. N. T. Raikhlin, I. M. Sneidman, Bull. eks. biol. i med., **60**, 112 (1965).
9. I. Tuma, Rez. în Fiz. Norm. și Patol., **13**, 17 (1967).
10. S. Gheție, A. Cioba, St. Cerc. Biochim. **7**, 359 (1964).
11. E. Biro, Kirérl. Orvostudomany Vizsg. Mdsz., **4**, 136, Akadémiai Kiadó, Budapesta (1958).
12. V. F. Predtecenschi, *Metode de laborator clinic*, Editura de Stat, București (1953).
13. S. M. Rapoport, H. J. Raderecht, *Physiologisch — Chemisches Praktikum*, VEB. Verlag Volk u. Gesundheit, Berlin (1967).
14. H. Kinny, H. J. Einbrodt, Int. Arch. Gewerbepath. Gewerbehyg., **25**, 1 (1968).
15. E. Weber, *Grundriss der Biologischen Statistik*, Fünfte Auflage, VEB. G. Fischer Verlag, Jena (1965).

PENTOSE AND ACIDOSOLUBLE PHOSPHORUS CONTENT IN RAT LUNGS DURING EXPERIMENTAL SILICOSIS

SUMMARY

Acidosoluble pentose and phosphorus concentrations were determined on a group of nineteen silicotic rats (eight to nine months old) as compared to 28 controls.

Determination followed both total and fractional concentrations of pentoses : (a) barium precipitable ; (b) barium + alcohol precipitable ; (c) non-precipitable with barium. It was shown that the global pulmonary concentration of pentoses is lower in silicotic animals as compared to controls (i.e. 1 .83 % and 2 .76 % respectively). The relative proportions between the three fractions are altered in silicosis ; this alteration is expressed as an increase in the non-precipitable fraction and a decrease in the barium + alcohol precipitable fraction.

Acidosoluble organic phosphorus concentration is significantly higher in silicosis, while the mineral phosphorus is only slightly higher as compared to controls.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 2, 163–170 (1971)

HIDROLIZA CU CATEPSINA E A IMUNOGLOBULINEI G DE IEPURE

SILVIA MIHĂESCU şi VICTOR GHEŢIE

Rezumat. S-a urmărit acţiunea catepsinei E, extrasă din măduva osoasă de iepure, asupra IgG de iepure şi a fragmentelor sale Fc şi Fc′.
S-a constatat că molecula de IgG este scindată în două fragmente, unul asemănător cu fragmentul peptic $F(ab')_2$ şi celălalt asemănător cu fragmentul Fc. Fragmentul Fc este scindat în continuare de către catepsina E pînă la un fragment rFc′, diferit de fragmentul Fc′. Fragmentul $F(ab)_2$ nu mai este atacat mai departe de catepsina E.

Eliminarea complexelor antigen-anticorp din organism se realizează prin mai multe canale, dintre care cel asigurat de activitatea leucocitelor polimorfonucleare este mult utilizat. Captarea complexelor imune de către PMN este un proces care conduce la îndepărtarea rapidă a complexelor antigen-anticorp din circulaţie şi la distrugerea ambilor parteneri.

În echipamentul hidrolazic al leucocitelor PMN au fost semnalate toate catepsinele cunoscute pînă acum, dar deosebit de bine reprezentată este catepsina E [1]. Ţinînd seama că această enzimă este prezentă şi în macrofage (mai mult în cele peritoneale decît în cele alveolare), pare rezonabil să considerăm catepsina E drept instrumentul principal prin care aceste celule fagocitare sînt capabile să „prelucreze" antigenele, în general, şi complexele antigen-anticorp, în special.

Într-o lucrare anterioară [2] s-a arătat că „granulele" lizozomiale, izolate prin centrifugare diferenţiată din leucocitele PMN, sînt capabile să degradeze imunoglobulina G de iepure pînă la stadiul de fragmente moleculare Fab, purtătoare ale situsului de combinare, pe cînd regiunea Fc, purtătoare a situsului de fixare a complementului, este distrusă complet. Această acţiune hidrolitică intensă este caracteristică şi macrofagelor preitoneale, dar nu poate fi realizată de nici o altă celulă, fie că aceasta provine din organe specializate în catabolizarea imunoglobulinei, ca ficatul [3] şi intestinul subţire [4], sau din organe în care are loc biosinteza ei, ca splina [5].

Deoarece în lucrarea sus amintită [2] nu s-a putut preciza dacă această acţiune se datorează catepsinei E sau celorlalte două catepsine, D şi B, prezente în leucocitele PMN, ne-am propus să lămurim acest punct, în lucrarea prezentă, utilizînd un preparat purificat de catepsină E, extras din măduva oaselor, ţesut cunoscut a fi foarte bogat în leucocite polimorfonucleare.

Lucrarea a urmărit un scop dublu : *a*) să elucideze etapele specifice de degradare a anticorpilor, în acest tip de celule, sub acțiunea catepsinei E ; *b*) să pună în evidență fragmentele de hidroliză avansată. Aceste fragmente vor constitui, în viitor, un material util pentru cunoașterea mai aprofundată a structurii anticorpilor. Utilizarea catepsinelor ca mijloace specifice de dezasamblare a moleculei imunoglobulinelor s-ar putea să fie cu deosebire valoroasă, în cazul cînd produșii obținuți prin scindarea acesteia s-ar dovedi a fi diferiți de cei rezultați sub acțiunea papainei sau pepsinei, singurii folosiți în prezent în cercetările de localizare a unor activități imunologice în moleculă.

MATERIAL ȘI METODE

Extracția catepsinei E. Catepsina s-a extras din măduvă osoasă de iepure după indicațiile date de Lapresle [6], ușor modificate. 25 g măduvă, scoasă prin spargerea oaselor lungi ale picioarelor anterioare și posterioare ale iepurelui, s-au mojarat cu nisip (circa 2 g) și cu 75 ml apă distilată (o parte țesut : 3 părți extractant), în gheață. Lipidele s-au separat la suprafață. S-a scurs lichidul de sub stratul de lipide, iar acestea s-au spălat, prin mojarare, cu cantități mici de apă distilată, apele de spălare adăugîndu-se la extractul principal. Extractul s-a dializat față de tampon fosfat 0,05 M, pH 8,0 cca 48 ore. S-a centrifugat 20 min, la 5 000 rot/min.

Purificarea catepsinei E s-a făcut prin două cromatografieri succesive pe DEAE-celuloză. 60 ml supernatant roșu, limpede (cca 400 mg proteină), s-au introdus într-o coloană (3,2 × 20 cm) cu DEAE-celuloză Whatmann, echilibrată cu tampon fosfat 0,05 M, pH 8,0. După eluarea proteinei neadsorbite, coloana s-a irigat cu tampon fosfat 0,05 M + NaCl 0,5 M, pH 8,0. Fracțiunea proteică desorbită astfel conține catepsina E. Fracțiunea s-a dializat față de tampon fosfat 0,005 M + NaCl 0,15 M, pH 5,75, s-a centrifugat 20 min la 5 000 rot/min și s-a introdus într-o coloană (2,4 × 18,5 cm) cu DEAE-celuloză Whatmann, echilibrată cu tampon fosfat 0,005 M + + NCal 0,15 M, pH 5,75. După spălarea proteinei neadsorbite s-a continuat eluția cu tampon fosfat 0,005 μ + NaCl 0,5 M, pH 5,75. Această ultimă fracțiune care conține catepsina E purificată, s-a concentrat de circa 5 ori prin perevaporare, concomitent cu dializă față de apă distilată și apoi față de ser fiziologic. Preparatul final obținut, cu o concentrație proteică de 1,44 mg/ml, s-a păstrat în soluție la 4°C sau înghețat la —10°C și s-a folosit în experiențele ulterioare de hidroliză.

Activitatea catepsinei E în diferite etape de purificare a fost testată la pH 2,5, în tampon citrat-HCl 0,2M, pe hemoglobină denaturată 1,5 %, după metoda indicată de C. de Duve [7] și folosită de noi într-o lucrare anterioară la determinarea activității catepsinei D [8].

Prepararea IgG de iepure. IgG de iepure s-a obținut prin precipitarea unui amestec de ser de iepure, cu $(NH_4)_2SO_4$, pînă la o saturare de 33 %, și purificarea acestei fracțiuni, prin trecere pe DEAE-celuloză, cu tampon fosfat 0,02 M, pH 8,0.

Prepararea fragmentului Fc s-a făcut prin hidroliza IgG de iepure (200 mg) cu papaină, în tampon fosfat de pH 7,0, 7 ore, după Porter [9].

Hidrolizatul s-a filtrat prin Sephadex G - 150 (2 × 115 cm) cu tampon fosfat 0,1 M + NaCl 0,2 M, pH 8,0, pentru separarea fragmentelor de hidroliză de IgG nehidrolizată. Piscul al doilea, ce conţine fragmentele Fab, Fc şi Fc', s-a dializat faţă de tampon acid acetic-acetat de sodiu 0,01 M, pH 5,5, şi s-a cromatografiat pe CM-celuloză (1,5 × 23 cm), cu gradient continuu, folosind ca tampon final acid acetic-acetat de sodiu 0,8 M, pH 5,5 şi un volum total de eluţie de 1 000 ml, realizat din 500 ml tampon de pornire şi 500 ml tampon final. Ultima fracţiune proteică eluată, ce conţine fragmentul Fc, s-a dializat faţă de apă distilată, s-a concentrat prin perevaporare şi s-a liofilizat.

Prepararea fragmentului Fc'. S-a hidrolizat IgG de iepure cu papaină la pH 5,5, 5 ore. Hidroliza s-a întrerupt prin dializă faţă de apă distilată rece, 48 ore. Preparatul dializat s-a liofilizat. Fragmentul Fc' nu s-a izolat din hidrolizat, ci s-a urmărit acţiunea catepsinei E asupra hidrolizatului total.

Marcarea cu ^{131}I a IgG şi a fragmentului Fc s-a făcut cu cloramină T, după indicaţiile date de Hunter [10]. Toate soluţiile folosite la marcare s-au făcut în tampon fosfat 0,15 M, pH 7,6. La 0,55 ml soluţie IgG sau Fc (2 mg/ml) s-au adăugat 0,01 ml $Na^{131}I$ (250 μ Ci) şi 0,2 ml soluţie cloramină T (1 mg/ml). După 10 min s-au mai adăugat 0,1 ml soluţie $S_2O_5Na_2$ (1,25 mg/ml) şi 0,1 ml soluţie KI (10 mg/ml). Amestecul s-a filtrat imediat printr-o coloană de Sephadex G - 25, cu ser fiziologic, sau s-a dializat faţă de ser fiziologic, la rece, cu schimbări dese, trei zile, pentru îndepărtarea iodului liber.

Hidroliza IgG şi a fragmentelor Fc şi Fc' cu catepsină E. S-a lucrat cu un raport enzimă / substrat de 1 : 10 şi 1 : 100. Concentraţia substratului a variat între 0,3 — 0,5 %. În experienţele în care s-a determinat radioactivitatea, proteina marcată s-a adăugat în cantitate mică, ea reprezentînd cca 5 % din proteina rece. Hidroliza s-a făcut în tampon citrat-HCl 0,2 M, pH 2,5, la 37°C, şi a avut o durată variabilă în funcţie de natura analizei ce s-a efectuat ulterior. Astfel, analizele imunoelectroforetice s-au făcut după 2, 6, 10 şi 16 sau 20 ore de hidroliză, iar analizele de gel-filtrare şi cele radiometrice, după 16 sau 20 ore de hidroliză.

Determinarea gradului de hidroliză a IgG şi a fragmentului Fc s-a făcut prin măsurarea radioactivităţii totale a hidrolizatelor şi a celei solubile în acid tricloracetic (TCA). Radioactivitatea totală s-a măsurat pe 0,1 ml hidrolizat. Pentru radioactivitatea solubilă în TCA s-au luat 0,2 ml hidrolizat şi s-au precipitat cu 0,4 ml TCA 10 %. După centrifugare, s-a măsurat radioactivitatea pe 0,3 ml supernatant. Din valorile găsite pentru martor, s-a determinat procentul de proteină hidrolizată.

Imunoelectroforeza s-a făcut în gel de agaroză 1 % în tampon veronal-veronal sodic μ 0,016, pH 8,0. În cuvă s-a folosit acelaşi tampon, dar cu forţă ionică mai mare (0,05). Migrarea s-a efectuat la 20 V/cm, intensitate maximă de 1 mA/cm, timp de 2 ½ ore. Ca antiseruri s-au folosit ser de porc antilanţ H de iepure şi ser de oaie antifragment Fc de iepure.

Gel-filtrarea prin Sephadex G - 150. Separarea produşilor de hidroliză, rezultaţi de pe urma acţiunii catepsinei E asupra IgG de iepure, s-a realizat prin trecerea hidrolizatelor (4 — 5 mg proteină) printr-o coloană (1 × 80 cm) de Sephadex G - 150. Irigarea s-a făcut cu tampon fosfat 0,1 M + NaCl 0,15 M, pH 8,0, la o viteză de 18 ml/oră.

REZULTATE

Acţiunea catepsinei E asupra imunoglobulinei G de iepure a fost urmărită prin : (*a*) metoda imunoelectroforetică, pentru evidenţierea şi identificarea imunochimică a fragmentelor care se eliberează din molecula atacată, (*b*) metoda cromatografiei de excludere moleculară, pentru separarea fragmentelor şi determinarea greutăţii lor moleculare, şi (*c*) metoda radiometrică, pentru măsurarea gradului proteolizei, ea indicînd şi cantitatea de IgG sau de fragmente care este hidrolizată pînă la nivelul peptidelor solubile în TCA.

Rezultatele experienţelor efectuate prin aceste trei metode de investigaţie au fost confruntate şi ne-au condus la propunerea următoarei scheme tentative * de degradare a IgG sub acţiunea catepsinei E (fig. 1).

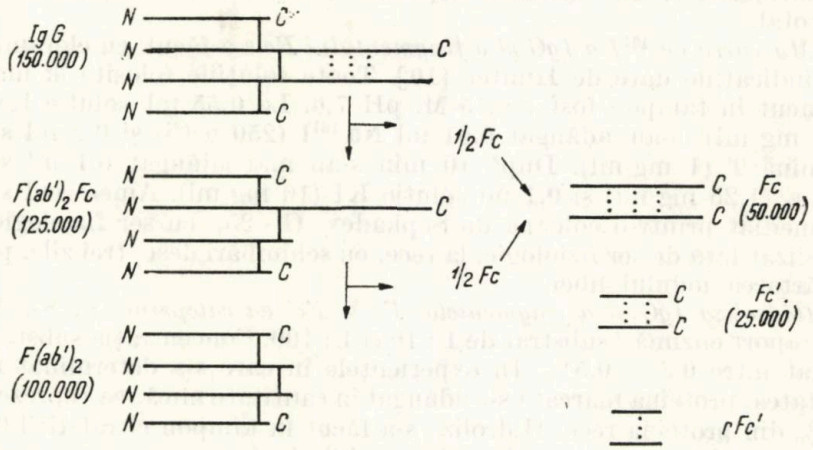


Fig. 1. Schemă ipotetică de scindare a IgG de iepure de către catepsina E. Liniile continue care unesc lanţurile H şi L reprezintă legăturile disulfidice. Liniile punctate reprezintă legături de hidrogen.

Schema arată că desprinderea regiunii Fc din molecula de IgG are loc în două etape (cîte una pentru fiecare lanţ H hidrolizat), care se succed însă atît de repede, încît un component de tipul $F(ab')_2Fc$ (adică o imunoglobulină din care lipseşte unul din capetele C-terminale ale lanţului H) poate fi pus în evidenţă numai cînd se lucrează cu o cantitate mică de enzimă (1 % din cantitatea de IgG supusă hidrolizei). Deoarece în urma acţiunii catepsinei E nu se obţin două fragmente Fab, ci numai unul singur, cu o greutate moleculară dublă, $F(ab')_2$, rezultă că scindarea lanţului H se face dincolo de puntea disulfidică intercatenară, spre capătul său C-terminal. De aceea, cele două unităţi Fab rămîn ataşate unul de

*) În această schemă am folosit pentru fragmentele obţinute prin acţiunea catepsinei E nomenclatura cu care sînt designate obişnuit fragmentele de imunoglobuline rezultate în urma acţiunii papainei sau pepsinei, dar acest lucru nu înseamnă că fragmentele obţinute de noi sînt identice cu cele rezultate prin acţiunea acestor din urmă enzime proteolitice. Numai pentru comoditate s-au utilizat termenii de fragmente Fab, Fc etc., în loc de fragmente asemănătoare cu acestea. Gradul lor de asemănare va putea fi apreciat numai după ce se vor cunoaşte exact aminoacizii terminali ai fragmentelor obţinute prin acţiunea catepsinei E.

celălalt, aşa cum, de altfel, se întîmplă atunci cînd ele rezultă din acţiunea pepsinei asupra IgG.

Regiunea Fc desprinsă din moleculă are o viaţă efemeră. La pH 2,5 la care s-a efectuat hidroliza (pH-ul optim de acţiune al catepsinei E), în fragmentul Fc au loc rearanjări conformaţionale care determină o relaxare a structurii sale compacte, urmată de o creştere a susceptibilităţii sale la acţiunea enzimei [11]. Din acest motiv fragmentul Fc nu poate fi observat în hidrolizat decît dacă hidroliza a fost de scurtă durată, sau dacă s-a folosit un exces de substrat.

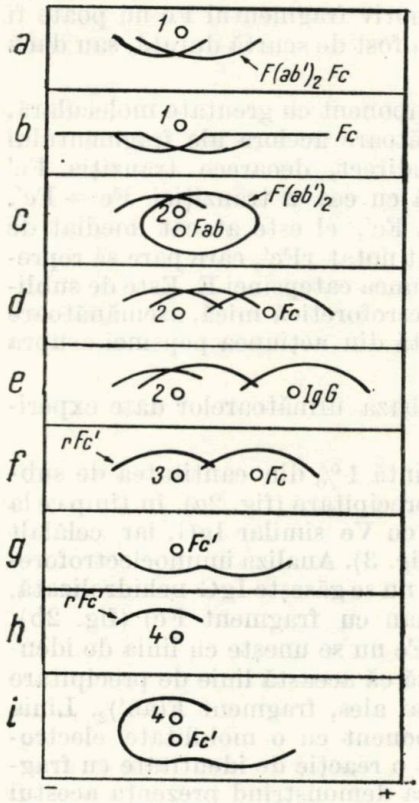
Micşoarea fragmentului Fc la un component cu greutate moleculară, sarcină electrică şi antigenicitate asemănătoare acelora ale fragmentului Fc′ obţinut cu papaină a fost probată indirect, deoarece tranziţia Fc′ → rFc′ are loc cu o viteză cel puţin egală cu cea a tranziţiei Fc → Fc′. În consecinţă , pe măsură ce se formează Fc′, el este atacat imediat de catepsina E şi transformat într-un fragment notat rFc′, care pare să reprezinte miezul rezistent, al regiunii Fc, la acţiunea catepsinei E. Este de subliniat că fragmentul rFc′ are o mobilitate electroforetică mică, asemănătoare cu aceea a fragmentului Pep III′, ce rezultă din acţiunea pepsinei asupra regiunii Fc.

Schema noastră a fost întocmită pe baza următoarelor date experimentale (fig. 2 şi 3).

La concentraţia de enzimă ce reprezintă 1% din cantitatea de substrat, se constată apariţia a două linii de precipitare (fig. 2*a*), în timp ce la cromatografie se obţin două piscuri : unul cu Ve similar IgG, iar celălalt cu Ve apropiat de cel al fragmentului Fc (fig. 3). Analiza imunoelectroforetică a arătat că în primul pisc cromatografic nu se găseşte IgG nehidrolizată, ci un fragment $F(ab')_2Fc$ (reacţie Osserman cu fragment Fc) (fig. 2b). Faptul că în reacţia Osserman linia $F(ab')_2Fc$ nu se uneşte cu linia de identificare a Fc în partea sa anodică, sugerează că această linie de precipitare ar putea conţine, în partea sa anodică mai ales, fragment $F(ab')_2$. Linia de precipitare corespunzătoare unui component cu o mobilitate electroforetică mai mică (fig. 2*a* şi 2*b*) a prezentat o reacţie de identitate cu fragmentul Fc, de aceea poate fi considerată ca demonstrînd prezenţa acestui fragment în hidrolizat.

Fragmentul $F(ab')_2$ apare în cantitate mare abia dacă se măreşte raportul enzimă/substrat la 1 : 10, cînd cromatografia evidenţiază un singur pisc, avînd un Ve cuprins între cel al IgG şi cel al fragmentului Fc (fig. 3). Identificările imunoelectroforetice au confirmat prezenţa majoritară a fragmentului $F(ab')_2$: reacţie de identitate cu fragment Fab pur (fig. 2 *c*), reacţie de identitate parţială faţă de IgG (fig. 2*e*) şi reacţie de neidentitate cu fragment Fc (fig. 2*d*). Cea de-a doua linie de precipitare mai catodică, a prezentat însă numai o reacţie de identitate parţială cu fragmentul Fc, dovedind că este vorba de un component cu dimensiuni moleculare mai mici (fig. 2*d*). Acest lucru a fost confirmat supunîndu-se hidrolizei fragmentul Fc obţinut din IgG prin hidroliză cu papaină. S-a observat că după o hidroliză prelungită linia Fc nu numai că slăbeşte în intensitate, dar prezintă şi o sărăcire în determinanţi antigenici, semn că a fost scindat şi a pierdut o parte din lanţul polipeptidic iniţial (reacţie de identificare cu godeu decalat) (fig. 2*f*).

În sfîrșit, supunînd fragmentul Fc′ (obținut prin hidroliza IgG cu papaină) acțiunii catepsinei E, se constată că arcul lung de precipitare (fig. 2g) își reduce întinderea și rămîne delimitat numai în tona startului (fig. 2h). Această comportare sugerează că fragmentul rFc′, ce rezultă din scindarea lui Fc′, este mai omogen decît acesta din urmă. Cum între Fc′



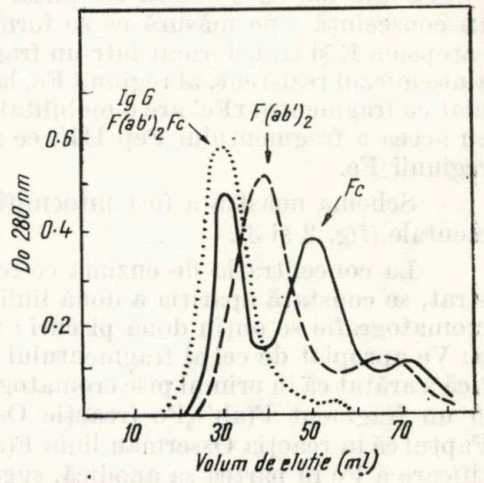


Fig. 3. Gel-filtrarea pe Sephadex G—150 a hidrolizatelor cu catepsină E. Hidrolizat de IgG la raportul enzimă : substrat de 1 :10 (– – –) și 1 : 100(———). IgG intact (. . .).

Fig. 2. Analiza imunoelectroforetică a produșilor de hidroliza ce rezultă din acțiunea catepsinei E asupra IgG de iepure și a fragmentelor sale Fc și Fc′. IgG hidrolizat cu catepsină E la un raport enzimă : substrat de 1 :100 (1) și 1 : 10 (2). Fc hidrolizat cu catepsină E la un raport 1 : 10 (3) și Fc′ hidrolizat cu catepsină E (4). Imaginile imunoelectroforetice reprezintă combinații de imunoelectroforeze în care liniile de precipitare au fost dezvoltate cu ser de porc anti lanț H de iepure sau cu ser de oaie anti fragment Fc. Pentru identificări s-au folosit tehnica Osserman și tehnica de migrare electroforetică cu godeu alăturat sau cu godeu decalat.

și rFc′ s-a constatat o reacție de identitate completă (fig. 2*i*), rezultă că scindarea nu îndepărtează zone antigenice din molecula Fc′.

Urmărind cantitatea de radioactivitate eliberată de catepsina E din IgG și din fragmentul Fc, găsim valori de 6 %, respectiv 22 %, ceea ce arată că : (*a*) desprinderea regiunii Fc din molecula IgG se face prin ruperea cîtorva legături peptidice, cu pierderea unei părți neînsemnate din lanțul H (probabil din regiunea balama a lanțului) ; (*b*) tranziția Fc→rFc′ înseamnă

micşorarea moleculei cu aproximativ un sfert, dacă s-ar considera că fragmentul Fc a fost uniform marcat. Această presupunere nu poate fi reală, deoarece dispoziţia tirozinelor în secvenţa Fc nu este uniformă şi deoarece tranziţia Fc→rFc′ presupune trecerea prin fragmentul Fc′, care, reprezintă deja aproximativ jumătate din molecula Fc. Rezultatele obţinute arată , mai degrabă, că fragmentul Fc se marchează cu predilecţie în partea sa C-terminală, care suferă o hidroliză limitată. Această posibilitate este susţinută de date din literatură care arată că jumătatea C-terminală a fragmentului Fc la iepure conţine aproximativ şase resturi tirozinice, în timp ce cealaltă jumătate are doar trei resturi tirozinice [12].

Hidroliza ca catepsină E a IgG de iepure demonstrează că această enzimă este responsabilă în mare măsură pentru efectul hidrolitic al granulelor lizozomiale din polimorfonucleare. Faptul că în hidrolizat, pe lîngă $F(ab')_2$, se menţine şi o cantitate mică, dar semnificativă, de rFc′ sugerează că distrugerea acesteia ar putea fi rezultatul acţiunii celorlalte catepsine din PMN, anume catepsina D sau B. Incapacitatea catepsinei E de a ataca fragmentul purtător al situsului de combinare nu este surprinzătoare în lumina acelor cercetări care au arătat că acest fragment nu-şi desface complet structura compactă decît la pH-uri încă mai acide decît cele folosite de noi. Oricum este puţin probabil ca astfel de pH-uri să existe în celulă chiar intralizozomial, astfel că explicarea modului în care este degradat fragmentul Fab trebuie căutată probabil în cooperarea sistemului cateptic cu un sistem disulfidreductazic capabil să „deschidă" regiunea Fab.

CONCLUZII

S-a demonstrat că sub acţiunea catepsinei E molecula imunoglobulinei G de iepure se scindează eliberîndu-se fragmente de tip $F(ab')_2$ şi fragmente care provin din degradarea regiunii Fc.

Prezentată la redacţie la 15 decembrie 1970

Laboratorul de imunochimie
Institutul de biochimie
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. J. Štefanovič, T. Webb, C. Lapresle, Ann. Inst. Pasteur, **103**, 276 (1962).
2. V. Gheţie, A. Sulica, Immunochemistry, **7**, 175 (1970).
3. V. Gheţie, C. Motaş, Immunochemistry, **8**, 120 (1971).
4. V Gheţie, C. Medeşan, Rev. roum. Biochim., **6**, 117 , (1969).
5. C. Motaş, V. Gheţie, Immunochemistry, **6**, 547 (1969).
6. C. Lapresle, T. Webb, Biochem. J.. **84**, 455 (1962).
7. C. De Duve, R. Wattiaux, P. Baudhuin, Advanc. Enzymol., **24**, 291 (1962).
8. S. Mihăescu, St. cerc. biochim., **13**, 155 (1970).
9. R. R. Porter, Biochem. J., **73**, 119 (1959).
10. W. H. Hunter, F. C. Greenwood, Nature, **194**, 495 (1962).
11. L. V. Abaturov, R. S. Nezlin, T. I. Vengerova, Ja. M. Varshavsky, Biochim. Biophys. Acta, **194**, 386 (1969).
12. R. I. Hill, R. Delaney, H. E. Lebovitz, R. E. Fellows, Proc. Royal. Soc. B., **166**, 159 (1966).

DIGESTION OF RABBIT IMMUNOGLOBULIN G BY CATHEPSIN E

SUMMARY

The action of rabbit bone marrow cathepsin E on rabbit IgG and its Fc and Fc′ fragments was pursued.

It was found that the IgG molecule is splitted into two fragments, one similar to the peptic $F(ab')_2$ fragment and the other one, similar to the Fc fragment. The Fc fragment is broken down further by cathepsin E, to a rFc′ fragment, differing from the Fc′ fragment. The $F(ab')_2$ fragment is no longer splitted by cathepsin E.

ST. CERC. BIOCHIM., 14 2, 171–175 (1971)

DEGRADAREA REGIUNII Fc DIN IMUNOGLOBULINA G DE IEPURE DE CĂTRE CATEPSINELE LIZOZOMIALE

CECILIA MOTAȘ, VICTOR GHEȚIE și SILVIA MIHĂESCU

Rezumat. Degradarea regiunii Fc din imunoglobulina G (IgG) de iepure poate avea loc în cîteva etape care reclamă intervenția concomitentă și succesivă a catepsinelor din sistemul lizozomial al celulei hepatice. Catepsinele B și D desprind fragmentul Fc din molecula IgG, catepsina B hidrolizează acest fragment în peptide și fragmentul Fc′, care este apoi hidrolizat complet de către catepsina E.

În experiențe anterioare am arătat că fracțiuni subcelulare bogate în lizozomi, izolate din ficatul de șobolan, nu pot distruge complet fragmentul Fc din IgG de iepure, hidroliza acestuia oprindu-se la fragmentul Fc′ [1]. În schimb, fracțiunea „granulară" din leucocitele polimorfonucleare (PMN) de cobai poate distruge complet fragmentul Fc al IgG de iepure [2]. Ceea ce deosebește cele două celule este prezența catepsinelor D și B în celula hepatică [3] — [5] și a catepsinelor D și E în leucocitele PMN [6].

În lucrarea prezentă ne-am propus să determinăm participarea catepsinelor B și D din ficat la degradarea regiunii Fc din IgG de iepure. În acest scop, am urmărit acțiunea hidrolitică a unei fracțiuni lizozomiale asupra IgG de iepure, în prezența sau în absența unor inhibitori specifici ai catepsinei B, pentru a disocia acțiunea acestei enzime de cea a catepsinei D [7]. Deoarece există date care sugerează că fracțiunea lizozomială din ficat poate conține și o cantitate mică de catepsină E [8], ne-am pus întrebarea dacă nu cumva incapacitatea ficatului de a distruge fragmentul Fc′ este legată de cantitatea prea mică de catepsină E prezentă în preparatele utilizate de noi [1]. De aceea, am încercat să hidrolizăm IgG de iepure cu o cantitate mai mare din fracțiunea lizozomială sau din preparatul brut de catepsină, în dorința de a realiza concentrația necesară atacării fragmentului. Fc′

MATERIAL ȘI METODE

Obținerea IgG. Imunoglobulina G de iepure s-a obținut prin precipitarea unui amestec de seruri de iepure cu sulfat de amoniu la o concentrație de 40%, urmată de cromatografie pe DEAE-celuloză, cu tampon fosfat 0,02 M, pH 8,0. Radioiodurarea IgG a fost descrisă într-o altă lucrare [1].

Izolarea fracțiunii subcelulare bogate în lizozomi. S-a obținut un omogenat de ficat de șobolan în zaharoză 0,25 M [1]. S-a îndepărtat fracțiunea de 900 g și apoi s-a centrifugat supernatantul 10 min la 21 500 g, colectîndu-se fracțiunea depusă. Depozitul s-a omogenizat adăugînd o cantitate mică de tampon citrat 0,1 M, pH 2,5 sau 3,5, astfel aleasă încît concentrația suspensiei, determinată prin tehnica W. Aldridge [9], să fie cuprinsă între 95 — 100 mg proteină/ml. Această suspensie a fost utilizată mai departe pentru hidroliza IgG (fracțiune lizozomială).

Obținerea preparatului brut de catepsină. Din omogenatul de ficat de șobolan din care s-a exclus fracțiunea de 900 g, s-a izolat apoi fracțiunea subcelulară ce se depune la o centrifugare de 60 min, la 5 000 g. Fracțiunea s-a suspendat în apă distilată, pînă la o concentrație de 20 mg proteină/ml, și apoi s-a înghețat-desghețat succesiv, de trei ori. Amestecul s-a centrifugat apoi la 5 000 g, 30 min, iar supernatantul s-a dializat la rece față de apă distilată, timp de 48 de ore. Precipitatul format s-a îndepărtat prin centrifugare, iar supernatantul s-a liofilizat (preparatul brut de catepsină).

Preparatul brut de catepsină are o activitate specifică de aproximativ 50 ori mai mare decît omogenatul de ficat obținut cu saponină [10]. Analizat electroforetic, în gel de agaroză, și apoi pus în contact cu o placă de gel ce conține hemoglobină, la pH 3,5 [11], se evidențiază două benzi cu activitate proteolitică, una intensă, în fața startului, și cealaltă, foarte slabă, în extremitatea anodică a plăcii. Judecînd după lucrările lui C. Lapresle și T. Webb [12], aceste benzi reprezintă catepsinele D, respectiv E. Activitatea cateptică a fost urmărită pe un substrat de hemoglobină [10]. La determinarea activității cateptice s-au folosit tampoane de citrat-HCl, respectiv citrat-NaOH și un raport de 1 p. enzimă la 10 p. IgG.

Hidroliza IgG. Peste 0,3 ml soluție de IgG în tampon citrat, pH 2,5 sau 3,5, 0,1 M, ce conținea 2 mg de proteină, s-au adăugat 0,2 ml suspensie de fracțiune lizozomială ce conținea fie 5 mg proteină (fracțiune lizozomială diluată), fie 20 mg proteină (fracțiune lizozomială concentrată) sau 0,2 ml din soluția de catepsină brută, făcută în același tampon, ce conținea 4 mg de proteină.

Hidroliza IgG în prezența inhibitorilor s-a făcut într-un amestec de reacție care conținea tampon citrat 0,1 M, pH 3,5, 4 mg/ml IgG, cisteină 0,01 M, suspensie de fracțiune lizozomială (aproximativ 20 mg/ml proteină) și 0,05—0,2 M iodacetamidă (IAA) sau 9 mg/ml p-cloromercuribenzoat (p-CMB). S-au făcut probe martor fără IAA sau p-CMB și fără cisteină.

Probele s-au incubat 16 ore la 37°C, apoi s-au adus la pH 8,0 și s-au centrifugat. Supernatantele s-au analizat imunoelectroforetic și prin gelfiltrare, pentru determinarea fragmentelor de hidroliză.

Metoda radiometrică de măsurare a eliberării peptidelor radioactive solubile în acid tricloracetic 5% a fost descrisă în altă parte [1].

Imunoelectroforeza. Electroforeza a durat două ore, la un potențial de 6 V/cm, în tampon barbital de pH 8,6, $\mu = 0{,}05$ (în cuvă) și 0,016 (în gel). S-a folosit un gel de agaroză 1%. Pentru imunoelectroforeză s-au utilizat un ser de capră anti-fragmente Fab și Fc și un ser de oaie anti-fragment Fc de iepure.

Gel-filtrarea. S-a folosit o coloană de 90/1,7 cm, umplută cu Sephadex G-150 şi eluată cu tampon Tris-HCl, pH 8,0, 0,1 M. S-au colectat fracţiuni de 2 ml, care s-au măsurat spectrofotometric (la 280 nm) şi radiometric (la o sondă de scintilaţie cu cristal).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Prin incubarea IgG de iepure cu fracţiunea lizozomială diluată, la pH 3,5, apar la imunoelectroforeză liniile de precipitare caracteristice fragmentelor Fab, Fc şi Fc′ [1] (fig. 1*a*). Mărind de patru ori concentraţia fracţiunii lizozomiale (fracţiunea lizozomială concentrată), la acelaşi pH, se constată distrugerea practic completă a fragmentului Fc, diagramele imunoelectroforetice conţinînd numai liniile fragmentelor Fab şi Fc′ (fig. 1*b*). Scăzînd pH-ul la 2,5 şi utilizînd tot fracţiunea lizozomială concentrată, se evidenţiază imunoelectroforetic numai linia de precipitare caracteristică fragmentului Fab, semn că fragmentele Fc şi Fc′ au fost complet distruse (fig. 1*c*). Acelaşi rezultat s-a obţinut dacă în locul fracţiunii lizozomiale concentrate s-a utilizat un preparat de catepsină brută, extras din fracţiunea bogată în lizozomi.

Aceste date sînt diferite de cele obţinute într-o lucrare anterioară [1], unde, în urma hidrolizei efectuate în aceleaşi condiţii fragmentul Fc′ se menţinea neatacat, alături de fragmentul Fab. Cele două experienţe s-au deosebit prin aceea că în experienţa prezentă s-a utilizat o cantitate de 4 — 5 ori mai mare din formaţiunea lizozomială decît în cea precedentă, ceea ce a determinat distrugerea completă a fragmentului Fc′. Faptul că hidroliza fragmentului Fc′ nu se poate realiza decît la pH 2,5 sugerează că ea necesită intervenţia catepsinei E, al cărei pH optim de acţiune este chiar 2,5. Deşi această enzimă a fost pusă în evidenţă prin enzimoelectroforeză în preparatul de catepsină folosit de noi (vezi metode), totuşi curba degradării imunoglobulinei radioactive în funcţie de pH, sub influenţa preparatelor de catepsină, nu arată nici măcar o asimetrie în ramura sa ascendentă, atingînd maximul la pH 3,2, la care fragmentul Fc′ nu este degradat (fig. 2).

Hidroliza fragmentului Fc′ se poate datori acţiunii catepsinei E. Faptul că fracţiunea „granulară" a leucocitelor PMN, bogată în catepsină E [6], poate hidroliza complet fragmentul Fc în absenţa cisteinei, în timp ce acest efect se poate observa numai cu o cantitate mare de fracţiune lizozomială din ficat şi numai la pH-ul optim de acţiune al catepsinei E, este un argument în favoarea presupunerii că fragmentul Fc′ se hidrolizează în urma acţiunii catepsinei E, prezentă în fracţiunea lizozomială izolată din ficat. Prezenţa catepsinei E în ficat poate fi accidentală, deoarece prezenţa leucocitelor PMN în omogenatul de ficat nu a fost exclusă (organele n-au fost perfuzate) şi, astfel, fracţiunea lizozomială poate conţine, de fapt, „granule" din leucocitele PMN, care să fie răspunzătoare de efectul constatat. Rezultatele noastre nu limitează acţiunea catepsinei E numai asupra fragmentului Fc′, enzima putînd realiza, desigur, şi scindarea IgG intacte sau a fragmentului Fc [13].

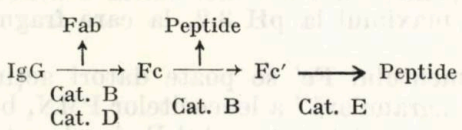
Trebuie menţionată şi posibilitatea ca hidroliza fragmentului Fc′ să nu aibă nici o legătură cu prezenţa catepsinei E în preparate, ci să fie

determinată de inducerea unor tranziții de configurație la nivelul regiunii Fc, mai marcate la pH-ul 2,5 decît la 3,5. Lucrările lui L.V. Abaturov și colab. [14] au arătat că, la un pH acid, în fragmentul Fc are loc o rearanjare conformațională, măsurată prin accelerarea schimbului $^1H - {}^2H$, care începe la pH 5,0 și devine foarte pronunțată la pH-ul 2,9. Cum rearanjarea conformațională determină o scădere a stabilității structurii rezultă că fragmentul Fc poate fi degradat mai avansat chiar de enzime care nu se găsesc la pH-ul optim de activitate, cum ar fi catepsina D sau chiar B.

Rolul ultimei enzime a fost scos în evidență urmărind activitatea proteolitică a fracțiunii lizozomiale diluate, în prezența unor inhibitori ai enzimelor SH-dependente, cum sînt iodacetamida (IAA) și p-cloromercuribenzoatul de sodiu. Rezultatele au fost comparabile. S-a observat că în prezența unei concentrații de 0,1 M IAA, cea mai mare parte din IgG nu este scindată, astfel că la gelfiltrarea amestecului peste Sephadex G-150 se obține un profil caracteristic pentru IgG nehidrolizată, spre deosebire de cazul în care s-a omis IAA, cînd în diagrama cromatografică apare și piscul fragmentelor Fab + Fc (fig. 3). Radioactivitatea solubilă în acid tricloracetic, eliberată în prezența IAA, reprezintă doar 20% din cea eliberată în absența acesteia. Existența unei radioactivități eliberate în prezența IAA, chiar așa mică cum este, arată că o parte din moleculele de IgG sînt totuși atacate și în prezența IAA. Acest lucru a putut fi verificat și imunoelectroforetic, diagramele conținînd liniile de precipitare ale fragmentelor Fab și Fc, alături de linia puternică dată de IgG nehidrolizată (fig. 4*c*). Se notează de asemenea dispariția liniilor Fab, Fc, și Fc′ atunci cînd concentrația IAA trece de la 0,05 la 0,15 M (fig. 4*b*, *c*, *d*).

Acest rezultat arată că atacul proteolitic al IgG este în mare măsură dependent de prezența catepsinelor B inhibate de agenți alchilanți [7], ceea ce sugerează că participarea lor la desprinderea regiunii Fc din molecula intactă de IgG și la hidroliza ei ulterioară pînă la fragmentul Fc′ ar putea fi decisivă.

Secvența de intervenție a catepsinelor asupra IgG ar putea fi schițată astfel :



Secvența intervenției catepsinelor, propusă de noi, se încadrează în schema generală a acțiunii catepsinelor asupra proteinelor, propusă de Tappel [15], cu deosebirea că noi nu considerăm necesar ca fiecare etapă de scindare să posede o singură enzimă proteolitică specifică, mai multe tipuri de catepsine putînd realiza procese hidrolitice foarte asemănătoare, întrucît intervenția lor este dictată de distribuția lor cantitativă în fracțiunea subcelulară dată.

CONCLUZII

Scindarea IgG în fragmente Fab și Fc este considerabil inhibată în prezența IAA, ceea ce sugerează că această primă etapă de degradare a IgG poate fi controlată mai degrabă de catepsina B decît de catepsina D.

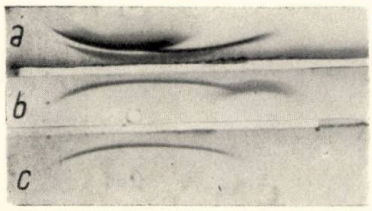


Fig. 1. — Imunoelectroforeza IgG de iepure incubată cu fracțiunea lizozomială și cu extract de catepsină parțial purificată extrasă din această fracțiune

a — fracțiune lizozomială diluată, la pH 3,5;
b — fracțiune lizozomială concentrată, la pH 3,5;
c — fracțiune lizozomială concentrată la pH 2,5.

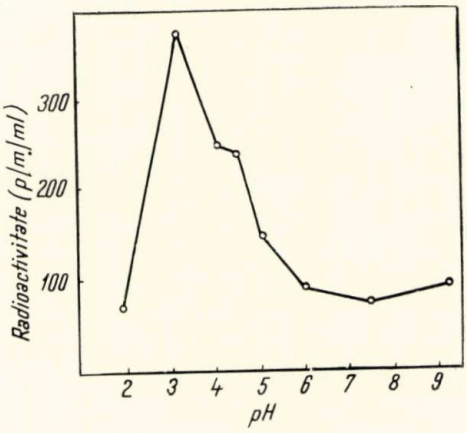


Fig. 2. — Hidroliza în funcție de pH a IgG de iepure cu catepsina parțial purificată

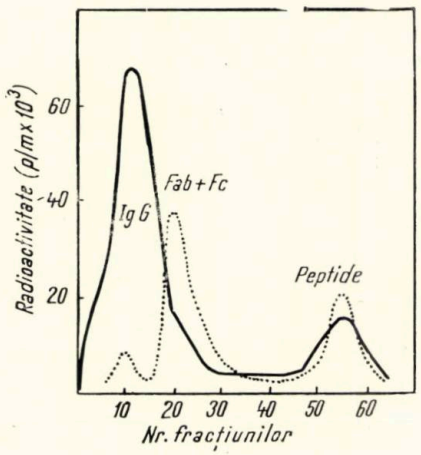


Fig. 3. — Gel-filtrarea pe Sephadex G—150 a IgG de iepure incubată cu fracțiunea lizozomială diluată

——— în prezența IAA 0,1 M
····· în absența IAA

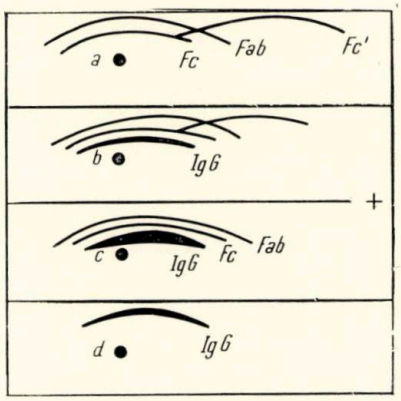


Fig. 4. — Imunoelectroforeza IgG de iepure incubată cu fracțiunea lizozomială diluată în prezența diferitelor concentrații de IAA

a — fără IAA; *b* — IAA 0,05 M; *c* — IAA 0,1 M; *d* — IAA 0,15 M.

Scindarea fragmentului Fc în fragment Fc' şi peptide pare a fi determinată exclusiv de acţiunea catepsinei B, deoarece este complet împiedicată prin adăugarea inhibitorilor acestei catepsine.

Fragmentul Fc' poate fi hidrolizat numai prin adăugarea unei cantităţi mari de preparat lizomial, la pH 2,5, ceea ce sugerează că această acţiune poate fi îndeplinită de catepsina E, prezentă în cantitate mică în lizozomii celulei hepatice.

Prezentată la redacţie la 30 aprilie 1970

Laboratorul de imunochimie
Institutul de biochimie
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. V. GHEŢIE, C. MOTAŞ, Immunochemistry, **8**, 120 (1971).
2. V. GHEŢIE, A. SULICA, Immunochemistry, **7** ,175 (1970).
3. E. M. PRESS, R. PORTER, J. CEBRA, Biochem., J., **74**, 501 (1960).
4. A. J. BARRETT, Biochem. J., **104**, 601 (1967).
5. O. SNELLMAN, Biochem. J., **144**, 673 (1969).
6. J. ŠTEFANOVIČ, T. WEBB, C. LAPRESLE, Ann. Inst. Pasteur, **103**, 276 (1962).
7. P. D. BOYER, (în) *The Enzymes*, sub red. P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck, Vol. I, Acad. Press. Inc. New York, 1959, p. 511.
8. C. MOTAŞ, St cerc. biochim., **13**, 169 (1970).
9. W. N. ALDRIDGE, Biochem. J., **67**, 423 (1957).
10. S. MIHĂESCU, St. cerc. biochim., **13**, 155, (1970).
11. P. D. WESTON, Immunol., **17**, 421 (1969).
12. C. LAPRESLE, T. WEBB, Biochem. J., **84**, 455 (1962).
13. S. MIHĂESCU, V. GHEŢIE, St. cerc. biochim., **14**, 163 (1971).
14. L. V. ABATUROV, R. S. NEZLIN, T. I. VENGEROVA, Ja. M. VARSHAVSKY, Biochim. Biophys. Acta, **194**, 386 (1969).
15. A. L. TAPPEL, (în) *Lysosomes in biology and pathology*, sub red. J. T. Dingle, H. B. Felb, Vol. II, North Holland Publ. Comp. Amsterdam-London, 1969, p. 207.

BREAKDOWN OF THE RABBIT IMMUNOGLOBULIN FC REGION BY LYSOSOMAL CATHEPSINS

SUMMARY

The breakdown of the Fc region from rabbit immunoglobulin G (IgG) can take place in several steps which claim the concomitant and successive intervention of cathepsins from the lysosomal system of the hepatic cell. Cathepsins B and D split the Fc fragment from the IgG molecule, B digests this fragment into peptides and Fc' fragment which is then completely digested by cathepsin E.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 2, 177 – 189 (1971)

UN MODEL TEORETIC AL CUPLAJULUI DINTRE REACȚIILE BIOCHIMICE ȘI DIFUZIA PRINTR-O MEMBRANĂ CELULARĂ

AUREL I. POPESCU

Rezumat. În lucrarea de față se prezintă un model teoretic al cuplajului dintre o reacție biochimică și fenomenul difuziei pasive printr-o membrană celulară. Acest cuplaj poate avea loc în celulele organismului scăldate de către fluxuri de lichide (de ex. flux de sînge). Sînt discutate condițiile în care un astfel de cuplaj poate să aibă loc. În final se sugerează verificarea experimentală a modelului.

Membranele biologice se întîlnesc la toate nivelele de organizare a materiei vii. Există foarte multe tipuri de membrane : multicelulare (de ex. intestinul, vezicile), celulare, subcelulare (de ex. membranele mitocondriale, nucleare). Aceste membrane joacă un rol extrem de important în desfășurarea proceselor biochimice și fiziologice din lumea vie.

Fără îndoială, cel mai important rol al membranelor este acela legat de transportul activ și selectiv al substanțelor, dar proprietățile membranelor naturale și artificiale pot, de asemenea influența energetica proceselor ce au loc în sistemele înconjurate sau împărțite de ele [7].

Noi presupunem că membranele selectiv permeabile favorizează cuplajul dintre reacțiile chimice și fenomenul de difuzie, ajutînd astfel la declanșarea reacțiilor endergonice sau la accelerarea altor procese (de ex. reacții exergonice).

Pentru ușurarea expunerii vom da de la început semnificația notațiilor folosite :

G_i = energia liberă a moleculelor aparținînd speciei R_i,
ΔG_{12} = variația energiei libere în timpul procesului (1),
K_{12} = constanta de echilibru a reacției (1),
c_i = concentrația moleculelor R_i, cînd se consideră celula ca un sistem izolat,
k_1 = constanta de viteză a reacției directe (1),
k_2 = constanta de viteză a reacției inverse (1),
R = constanta universală a gazelor,
T = temperatura absolută a sistemului,
t = variabila timp,

$$k_{i,\,i+1,\ldots,j-1,j} = \sum_{r=i}^{j} k_r,$$

M_2 = masa moleculelor R_2,
P = coeficientul de permeabilitate al membranei,
S = suprafața membranei scăldată de fluxul de fluid,
Δc = variația de concentrație a moleculelor R_2, de o parte și de alta a membranei,
c_{2e} = concentrația moleculelor R_2, în exteriorul celulei,
c_{2i} = concentrația moleculelor R_2, în interiorul celulei,
V = volumul celulei,
$\mathfrak{M}_2$ = masa moleculară a moleculelor R_2,
L = dimensiunea liniară a celulei,
$T_{1/2}$ = timpul de înjumătățire a moleculelor reactantului R_2, datorită fenomenului de difuzie,
c_i^* = concentrația moleculelor reactantului R_i în cazul în care are loc cuplajul.

$$A = (-k_1 + k_{23})/2\,(k_{123}^2 - 4k_1k_3)^{1/2} + 1/2$$
$$B = (+k_1 - k_{23})/2(k_{123}^2 - 4k_1k_3)^{1/2} + 1/2$$
$$D = (k_{123}^2 - 4k_1 k_3)^{-1/2}$$
$$2X = k_{123} - (k_{123}^2 - 4k_1k_3)^{1/2} > 0$$
$$2Y = k_{123} + (k_{123}^2 - 4k_1k_3)^{1/2} > 0$$

REACȚII ENDERGONICE ÎN CELULĂ

Să luăm în considerare o celulă care căptușește peretele intern al unui vas de sînge, deci care este în permanență scăldată de către un flux de lichid. De la început vom neglija caracterul multicompartimentat al celulei, adică vom admite că moleculele R_i ($i = 1,2$) au aceeași concentrație în întreg volumul celular. În realitate, celula are un mare număr de compartimente și de aceea ar trebui luate în considerare concentrații diferite pentru diferitele compartimente [9].

Pentru început vom mai considera că celula este un sistem izolat și că în ea se află un mare număr de molecule aparținînd speciei R_1. Numărul moleculelor R_1 trebuie să fie suficient de mare pentru a avea de a face cu un sistem termodinamic.

Presupunem că există posibilitatea de transformare chimică a moleculelor R_1 în moleculele R_2 și invers :

$$R_1 \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} R_2. \tag{1}$$

Din punct de vedere energetic există două posibilități :

$$\Delta G_{12} = G_2 - G_1 < 0, \tag{2}$$

$$\Delta G_{12} = G_2 - G_1 > 0. \tag{3}$$

În primul caz, conform principiului al doilea al termodinamicii, transformarea moleculelor R_1 în R_2 este spontană și o astfel de reacție se numește exergonică [5], [6].

În al doilea caz transformarea moleculelor R_1 în R_2 nu mai este un proces spontan. Pentru a declanșa o astfel de reacție e necesar un aport energetic exterior. O astfel de reacție se numește endergonică [5], [6].

Vom presupune că în celula de mai sus are loc o reacție endergonică, deci moleculele speciei R_2 se găsesc în cantitate foarte mică. Echilibrul dintre R_1 și R_2 este caracterizat de constanta K_{12}, dată de legea acțiunii maselor :

$$K_{12} = c_2/c_1 = k_1/k_2 \ll 1. \tag{4}$$

Aplicînd reacției (1) teoria cineticii chimice, se poate scrie următorul sistem de ecuații diferențiale :

$$dc_1/dt = - k_1 c_1 + k_2 c_2, \tag{5a}$$

$$dc_2/dt = + k_1 c_1 - k_2 c_2. \tag{5b}$$

Rezolvînd acest sistem obținem pentru concentrații următoarele expresii (Apendice, partea a II-a)

$$c_1(t) = c_1^0/k_{12} [k_2 + k_1 \exp(- k_{12} t)], \tag{6a}$$

$$c_2(t) = c_1^0 k_1/k_{12} [1 - \exp(- k_{12} t)], \tag{6b}$$

dacă impunem următoarele condiții inițiale :

$$c_1(0) = c_1^0, \tag{7a}$$

$$c_2(0) = 0. \tag{7b}$$

Acum sîntem în măsură să apreciem ce devin concentrațiile c_1 și c_2 după un timp foarte lung. Din relațiile (4), (6a), (6b) se obține :

$$c_1(\infty) = \lim_{t \to \infty} c_1(t) = c_1^0 k_2/k_{12} \cong c_1^0, \tag{8a}$$

$$c_2(\infty) = \lim_{t \to \infty} c_2(t) = c_1^0 k_1/k_{12} \cong 0. \tag{8b}$$

În concluzie, într-un sistem izolat, o reacție endergonică (mai general : un proces endergonic) nu poate avea loc.

Dacă nu mai considerăm celula ca un sistem izolat și dacă, printr-un anumit procedeu, îndepărtăm moleculele R_2 din mediul de reacție (i.e. celulă), atunci, ca o consecință a constanței lui K_{12}, trebuie ca concentrația moleculelor R_1 să scadă. În felul acesta, o parte din moleculele speciei R_1 este transformată în molecule ale speciei R_2. Îndepărtînd în mod permanent reactantul R_2, se asistă la o promovare sistematică a reacției (1) de la „stînga spre dreapta".

LEGEA LUI FICK „MODIFICATĂ"

De acum înainte vom considera că membrana celulară este permeabilă pentru moleculele speciei R_2 şi impermeabilă pentru moleculele speciei R_1. Deci celula nu mai este un sistem izolat.

Vom scrie legea difuziei prin membrana celulei în cauză sub o formă similară cu ecuaţiile de cinetică chimică de gradul I. Variaţia masei totale a moleculelor R_2 cu timpul, în interiorul celulei, datorită difuziei, este dată de legea lui Fick [6]:

$$\mathrm{d}M_2/\mathrm{d}t = P \cdot S \Delta c. \tag{9}$$

Ca o consecinţă a faptului că $\mathrm{d}M_2/\mathrm{d}t < 0$, rezultă $\Delta c < 0$. În ipoteza că celula este în mod continuu scăldată de către fluxul de sînge, concentraţia exterioară a reactantului R_2 este zero. Deci:

$$\Delta c = + c_{2e} - c_{2i} = - c_2. \tag{10}$$

Deoarece $M_2 = c_2 V \mathfrak{M}_2$, legea lui Fick, se poate scrie sub forma:

$$\mathrm{d}c_2/\mathrm{d}t = - k_3 c_2, \tag{11}$$

unde

$$k_3 = PS/\mathfrak{M}_2 V. \tag{12}$$

Rezolvînd ecuaţia (11) şi impunînd condiţia iniţială $c_2(0) = c_2^0$, se obţine următoarea soluţie:

$$c_2(t) = c_2^0 \exp(- k_3 t). \tag{13}$$

Datorită dependenţei exponenţiale, în raport cu timpul, a concentraţiei reactantului R_2, se trage concluzia că difuzia este totuşi un fenomen rapid; mai mult, $k_3 \sim L^{-1}$, deci cu cît dimensiunea compartimentului este mai mică, cu atît k_3 este mai mare şi, deci, cu atît descreşterea concentraţiei este mai pregnantă.

Timpul de înjumătăţire (i.e. timpul în care jumătate din molecule a difuzat prin membrană) este dat de expresia:

$$T_{1/2} = \mathfrak{M}_2 V \ln 2/P \cdot S. \tag{14}$$

Vom sumariza discuţia despre difuzie în următoarea formulă:

$$c_2(\infty) = \lim_{t \to \infty} c_2(t) = 0. \tag{15}$$

CUPLAJUL DINTRE DIFUZIE ȘI REACȚIA ENDERGONICĂ

Să considerăm acum cazul general în care reacția endergonică (1) este simultană și cuplată cu difuzia. Despre un astfel de cuplaj, în care un fenomen scalar (reacția chimică) este cuplat cu un fenomen vectorial (difuzia), se va discuta ceva mai tîrziu. Fenomenul complex este reprezentat prin schema de mai jos (fig. 1)

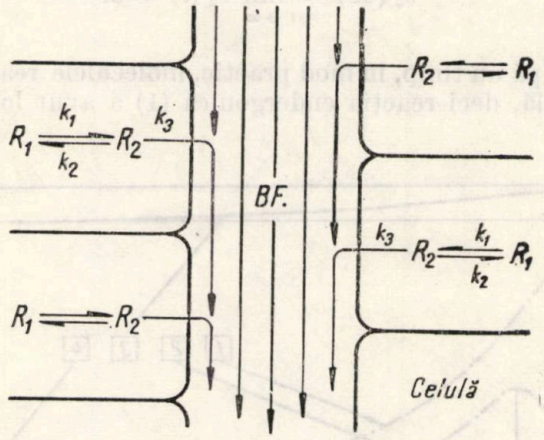


Fig. 1. Reprezentarea schematică a cuplajului dintre reacția chimică $R_1 \rightleftharpoons R_2$ și fenomenul de difuzie B.F. = fluxul de fluid prin vasul de sînge.

Variația concentrațiilor reactanților R_i $(i = 1,2)$ în timp este descrisă de următorul sistem de ecuații diferențiale :

$$dc_1^*/dt = -k_1 c_1^* + k_2 c_2^*, \tag{16a}$$

$$dc_2^*/dt = +k_1 c_1^* - k_{23} c_2^*. \tag{16b}$$

Impunînd condițiile inițiale

$$c_1^*(0) = c_1^0, \tag{17a}$$

$$c_2^*(0) = 0, \tag{17b}$$

se obțin pentru sistem, următoarele soluții (Apendice, partea I) :

$$c_1^*(t) = c_1^0 [A \exp(-Xt) + B \exp(-Yt)], \tag{18a}$$

$$c_2^*(t) = c_1^0 D [\exp(-Xt) - \exp(-Yt)]. \tag{18b}$$

Avînd în vedere faptul că $X > 0$, $Y > 0$ se deduc din (18a) și (18b) următoarele relații :

$$c_1^*(\infty) = \lim_{t \to \infty} c_1^*(t) = 0, \tag{19a}$$

$$c_2^*(\infty) = \lim_{t \to \infty} c_2^*(t) = 0. \tag{19b}$$

Se observă că după un timp, în mod practic, moleculele reactantului R_1 vor dispare din celulă, deci reacția endergonică (1) a avut loc. Să remarcăm

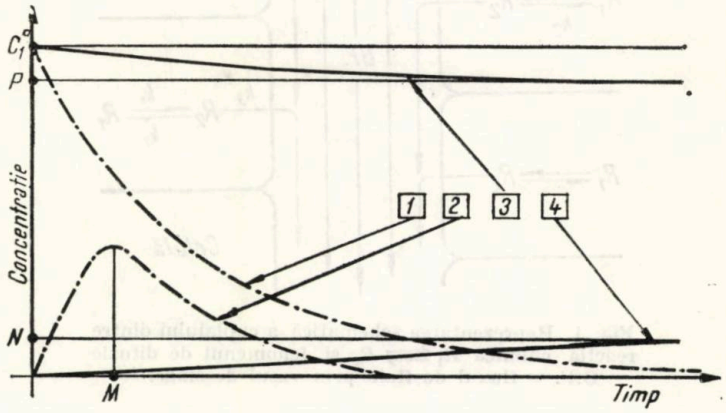


Fig. 2. Dependența de timp a concentrațiilor c_1, c_2, c_1^*, c_2^* 1). $c_1^* = c_1^*(t)$; 2) $c_2^* = c_2^*(t)$; 3) $c_1 = c_1(t)$; 4). $c_2 = c_2(t)$; Abscisa punctului M este $(\ln X - \ln Y)/(X - Y)$. Ordonata lui N este $C_1^0\, k_1/k_{12}$ și a lui P este $C_1^0\, k_2/k_{12}$.

totuși faptul că timpul de dispariție a reactantului R_1 nu este prea mare, datorită dependenței exponențiale a concentrației c_1^* de timp.

Comparînd relațiile (8a) și (19a), deducem că reacțiile endergonice pot să aibă loc în sisteme deschise, prin cuplarea lor cu un fenomen fizic (e. g. difuzie). Pentru compararea celor două cazuri, vezi de asemenea schema de mai jos (fig. 2).

Trebuie să remarcăm rolul membranei celulare în acest cuplaj. Membrana „introduce" anizotropie în mediu (datorită structurii sale), făcînd astfel posibil cuplajul dintre fenomene cu ordine tensoriale diferite (vezi mai departe).

Acest cuplaj are loc nu numai la nivelul membranei celulare, ci și la alte nivele (e. g. subcelulare și pluricelulare) și, în general, oriunde o membrană selectiv permeabilă separă un sistem de reactanți și este scăldată pe suprafața externă de către un flux de fluid.

De fapt, în fenomenul descris se mai asistă la un cuplaj. E vorba de cuplajul dintre difuzie și fluxul mecanic de fluid. Îndepărtarea mecanică a produșilor unui proces endergonic ar fi un mod de a furniza energie sistemului, făcînd ca reacțiile endergonice să se producă într-o măsură considerabilă [5].

DESPRE POSIBILITATEA DE REALIZARE A CUPLAJULUI

Descrierea proceselor cuplate prin intermediul termodinamicii proceselor ireversibile întîmpină unele greutăți, din cauza principiului de simetrie al lui Pierre Curie. Acest principiu interzice cuplajul între fenomene cu ordine tensoriale diferite (de ex. reacții chimice și difuzie) [1], [3], [4], [8]. Totuși, în literatură sînt menționate cazuri cînd astfel de cuplaje au loc. Vom prezenta cîteva din ele.

Cu ajutorul teoriei simple a stărilor de tranziție, aplicate transferului printr-un „por" din membrană, și folosind modulele pentru reprezentarea forțelor și fluxurilor, Acland (1966) a cuplat difuzia cu o reacție chimică.

Cullinam și DiPirro [4] dau un model al transportului activ printr-o membrană, care conduce la un cuplaj local între reacția chimică și difuzie, ca o consecință a structurii asimetrice a sistemului.

Bright [3] prezintă, în extenso, opiniile multor oameni de știință în legătură cu principiul lui Curie. El chiar dă formularea originală a lui Curie. Se poate conchide din lucrarea lui Bright că acest principiu nu se aplică mediilor anizotrope și, deci, nici transportului prin membrane, care sînt, prin excelență, medii anizotrope.

Din cele de mai sus se desprinde concluzia că principiul lui Curie nu se aplică proceselor ce au loc în medii anizotrope.

Am fi putut să trecem peste această discuție, deoarece nu s-a folosit formalismul termodinamicii ireversibile, ci un formalism de cinetică chimică. În felul acesta, cuplarea formală s-a făcut fără nici o dificultate.

Cuplajul descris servește nu numai pentru declanșarea și întreținerea reacțiilor endergonice, dar și la accelerarea unor procese exergonice (de ex. reacții exergonice).

VERIFICAREA EXPERIMENTALĂ A MODELULUI

Pentru verificarea prezicerilor teoretice de mai sus, propunem un model experimental constînd din următoarele :

a) un sistem de reactanți (R_1, R_2) solubili într-un solvent (de ex. apă), astfel ca reacția $R_1 \rightleftharpoons R_2$ să fie endergonică ;

b) o membrană naturală sau artificială, care să fie permeabilă pentru R_2, dar impermeabilă pentru R_1 ;

c) un flux de fluid (de ex. apa), datorat unei diferențe de presiune hidrostatică.

O reprezentare schematică a unei posibile „instalații experimentale" este dată mai jos (fig. 3).

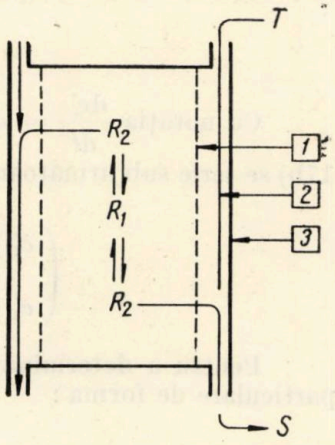


Fig. 3. Reprezentarea schematică a instrumentului care poate fi folosit experimental. *1* — Membrană selectiv permeabilă ; *2* — Fluxul de fluid datorită diferenței de presiune hidrostatică între rezervorul (*T*) și chiuveta (*S*). *3* — Container.

Experiența trebuie să verifice următoarele date :

1. c_1^* este o funcție exponențială de timp și
2. $dc_1^*/dt < 0$; $c_1^*(\infty) = 0$.

DISCUȚII

Membranele biologice conferă sistemelor vii un caracter multicompartimentat, neomogen și anizotrop, făcînd astfel posibil cuplajul între fenomene cu ordine tensoriale diferite în aceste sisteme.

În celulele cu poziții topologice particulare în sistemele vii, este posibil să se declanșeze, să se întrețină sau să se accelereze anumite reacții biochimice de către fenomenul de difuzie.

Un rol important în fenomenul de cuplaj descris îl joacă îndepărtarea mecanică, de către fluxul de fluid, a produșilor reacțiilor biochimice, difuzați prin membrană.

Deoarece modelul prezentat mai sus are o formă generală, el este oarecum schematic, dar poate fi și trebuie complicat treptat, pentru a descrie realitatea în mod fidel. Astfel, am putea considera reacția (1) de forma $R_1 + R_2 \rightleftharpoons R_3 + R_4$ sau de o formă mai complexă. De asemenea, am putea considera în model că în interiorul celulei se produc numeroase reacții biochimice. Dacă substanțele difuzive sînt încărcate electric, trebuie să se ia în considerare potențialul de membrană.

Autorul mulțumește pe această cale dr. C. Neacșu, dr. G. Ciuștea și dr. Z. Simon pentru discuțiile purtate în legătură cu lucrarea.

APENDICE

PARTEA I

Cu notația $\frac{\mathrm{d}c_i^*}{\mathrm{d}t} = \dot{c}_i^*$ $(i = 1,2)$ sistemul de ecuații diferențiale (17a, 17b) se scrie sub următoarea formă matriceală :

$$\begin{pmatrix} \dot{c}_1^* \\ \dot{c}_2^* \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -k_1 & +k_2 \\ +k_1 & -k_{23} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} c_1 \\ c_2 \end{pmatrix} \tag{1}$$

Pentru a determina un sistem fundamental de soluții se caută soluții particulare de forma :

$$\begin{pmatrix} c_1^* \\ c_2^* \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} A_1 \\ A_2 \end{pmatrix} \mathrm{e}^{rt} \tag{2}$$

unde : A_1, A_2 și r sînt constante ce urmează a fi determinate.

Derivînd în raport cu timpul în ambii membri ai relației (2) se obține :

$$\begin{pmatrix} \dot{c}_1^* \\ \dot{c}_2^* \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} A_1 r \\ A_2 r \end{pmatrix} \mathrm{e}^{rt}. \tag{3}$$

Ținînd cont de (2) și (3) sistemul (1) devine :

$$\begin{pmatrix} A_1 r \\ A_2 r \end{pmatrix} e^{rt} = \begin{pmatrix} -k_1 & +k_2 \\ +k_1 & -k_{23} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A_1 \\ A_2 \end{pmatrix} e^{rt}. \tag{4}$$

Efectuînd înmulțirea dintre cele două matrici, din membrul drept, și trecînd totul în membrul stîng al egalității (4), rezultă :

$$\begin{pmatrix} (r + k_1) A_1 - k_2 A_2 \\ -k_1 A_1 + (r + k_{23}) A_2 \end{pmatrix} e^{rt} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \end{pmatrix}. \tag{5}$$

Din (5) rezultă următorul sistem algebric în A_1 și A_2 :

$$\begin{aligned} (r + k_1) A_1 \quad - k_2 A_2 &= 0, \\ -k_1 A_1 + (r + k_{23}) A_2 &= 0. \end{aligned} \tag{6}$$

Sistemul (6) fiind liniar și omogen în A_1 și A_2, pentru a avea soluții nebanale trebuie ca determinantul sistemului să fie nul :

$$D(r) = \begin{vmatrix} r + k_1 & -k_2 \\ -k_1 & r + k_{23} \end{vmatrix} = 0. \tag{7}$$

Din (7) se obține următoarea ecuație caracteristică în r :

$$r^2 + k_{123} r + k_1 k_3 = 0. \tag{8}$$

Soluțiile ecuației (8) sînt :

$$r_1 = \frac{-k_{123} + (k_{123}^2 - 4k_1 k_3)^{1/2}}{2}, \tag{9}$$

$$r_2 = \frac{-k_{123} - (k_{123}^2 - 4k_1 k_3)^{1/2}}{2}.$$

Acestor două valori proprii r_1 și r_2 le corespund doi vectori proprii :

$$\bar{A}_1 = \begin{pmatrix} A_1' \\ A_2' \end{pmatrix} e^{r_1 t}, \tag{10}$$

$$\bar{A}_2 = \begin{pmatrix} A_1'' \\ A_2'' \end{pmatrix} e^{r_2 t}. \tag{11}$$

Pentru a afla A_1', A_2' se observă că

$$D(r_1) = \begin{vmatrix} r_1 + k_1 & -k_2 \\ -k_1 & r_1 + k_{23} \end{vmatrix} = 0 \tag{12}$$

și că

$$A_1' = \text{Minor}\,(r_1 + k_1) = r_1 + k_{23}, \tag{13}$$

$$A_2' = \text{Minor}\,(-k_2) = k_1. \tag{14}$$

Ținînd cont de (13) și (14) în (10) rezultă :

$$\bar{A}_1 = \begin{pmatrix} r_1 + k_{23} \\ + k_1 \end{pmatrix} \cdot e^{r_1 t}. \tag{10'}$$

Analog se obține :

$$\bar{A}_2 = \begin{pmatrix} r_2 + k_{23} \\ + k_1 \end{pmatrix} \cdot e^{r_2 t}. \tag{11'}$$

Vectorii $\bar{A}_1$ și $\bar{A}_2$ sînt soluții particulare ale sistemului (1). Pentru a alcătui cu ei soluția generală, trebuie ca ei să formeze un sistem fundamental de soluții, adică trebuie ca determinantul lui Wronski atașat să fie nenul. În cazul de față determinantul lui Wronski este

$$W = \begin{vmatrix} A_1' & A_1'' \\ A_2' & A_2'' \end{vmatrix} \cdot e^{r_{12} t} = k_1 (r_1 - r_2)\, e^{r_{12} t} \neq 0. \tag{15}$$

Prin urmare $\bar{A}_1$ și $\bar{A}_2$ formează un sistem fundamental de soluții. Soluția generală a sistemului este o combinație liniară de $\bar{A}_1$ și $\bar{A}_2$

$$\bar{C}^* = p_1 \bar{A}_1 + p_2 \bar{A}_2, \tag{16}$$

unde p_1 și p_2 sînt constante ce se determină din condițiile inițiale ale sistemului.

Soluția (16) se scrie desfășurat sub forma

$$\bar{C}^* = \begin{pmatrix} c_1^* \\ c_2^* \end{pmatrix} = p_1 \begin{pmatrix} A_1' \\ A_2' \end{pmatrix} e^{r_1 t} + p_2 \begin{pmatrix} A_1'' \\ A_2'' \end{pmatrix} e^{r_2 t}. \tag{17}$$

Ținînd cont de expresiile lui A_1', A_2', A_1'', A_2'' (17) devine :

$$\begin{pmatrix} c_1^* \\ c_2^* \end{pmatrix} = p_1 \begin{pmatrix} r_1 + k_{23} \\ k_1 \end{pmatrix} e^{r_1 t} + p_2 \begin{pmatrix} r_2 + k_{23} \\ k_1 \end{pmatrix} e^{r_2 t}. \tag{17'}$$

Din (17') rezultă soluția generală a sistemului :

$$\begin{aligned} c_1^*(t) &= p_1 (r_1 + k_{23})\, e^{r_1 t} + p_2 (r_2 + k_{23})\, e^{r_2 t} \\ c_2^*(t) &= p_1 k_1 e^{r_1 t} + p_2 k_1\, e^{r_2 t}. \end{aligned} \tag{18}$$

Impunînd condițiile inițiale :

$$\begin{aligned} c_1^*(0) &= c_1^0, \\ c_2^*(0) &= 0, \end{aligned} \tag{19}$$

rezultă următorul sistem algebric în p_1 și p_2 :

$$\begin{aligned} c_1^0 &= p_1 (r_1 + k_{23}) + p_2 (r_2 + k_{23}), \\ 0 &= p_1 k_1 + p_2 k_1. \end{aligned} \tag{20}$$

Din (20) ținînd cont de expresiile lui r_1 și r_2 date de (9) rezultă :

$$p_1 = -\, p_2 = c_1^0 (k_{123}^2 - 4 k_1 k_2)^{-1/2}. \tag{21}$$

Ţinînd cont de (9) şi (21) în (18) rezultă soluţiile sistemului (1), funcţie de constantele de viteză şi de timp :

$$c_1^*(t) = c_1^0\left\{\left[\frac{-k_1+k_{23}}{2(k_{123}^2-4k_1k_3)^{1/2}}+1/2\right]\exp\left[-\frac{k_{123}-(k_{123}^2-4k_1k_3)^{1/2}}{2}t\right]+\right.$$

$$\left.+\left[\frac{+k_1-k_{23}}{2(k_{123}^2-4k_1k_3)^{1/2}}+1/2\right]\exp\left[\frac{-k_{123}-(k_{123}^2-4k_1k_3)^{1/2}}{2}t\right]\right\} \quad (22a)$$

$$c_2^*(t) = \frac{c_1^0k_1}{2(k_{123}^2-4k_1k_3)^{1/2}}\left\{\exp\left[-\frac{k_{123}-(k_{123}^2-4k_1k_3)^{1/2}}{2}t\right]+\right.$$

$$\left.+\exp\left[-\frac{k_{123}-(k_{123}^2-4k_1k_3)^{1/2}}{2}t\right]\right\} \quad (22b)$$

Făcînd notaţiile menţionate la începutul lucrării rezultă soluţiile sistemului sub forma :

$$\begin{aligned} c_1^*(t) &= c_1^0[A\exp(-Xt)+B\exp(-Yt)], \\ c_2^*(t) &= c_1^0 D[\exp(-Xt)-\exp(-Yt)]. \end{aligned} \quad (23)$$

PARTEA A II-A

Făcînd în (22a) şi (22b) pe $k_3 = 0$ rezultă :

$$\begin{aligned} c_1^*(t) &= c_1(t) = c_1^0/k_{12}[k_2+k_1\exp(-k_{12}t)], \\ c_2^*(t) &= c_2(t) = c_1^0k_1/k_{12}[1-\exp(-k_{12}t)]. \end{aligned} \quad (24)$$

Acestea sînt tocmai soluţiile sistemului de ecuaţii diferenţiale (6a), (6b) din lucrare.

Prezentat la redacţie la 21 noiembrie 1970

Institutul oncologic Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. Acland, J. D., J. Theoret, Biol., **13**, 318 (1966).
2. Acland, J. D., J. Theoret, Biol., **22**, 535 (1969).
3. Bright, P. B., J. Theoret, Biol., **23**, 135 (1969).
4. Cullinam, H. T. Jr., DiPirro, G. B., J. Theoret. Biol., **23**, 11, 1969.
5. Fruton, J. S., Simmonds, S., *General Biochemistry*, John Wiley & Sons. Inc., New York 1959, p. 228–233, 241.

6. GHEORGHIU TR., GROSSU T., SĂHLEANU V., *Introducere în biofizică*, Ed. Științifică, București, 1967, p. 28, 155.
7. GUTFREUND, H., in *Advances in Enzymology*, vol. II, Interscience Publishers, Inc., New York, 1951, p. 22.
8. GUMINSKI, K., *Termodinamica proceselor ireversibile*, Ed. Academiei R.S.R., București, 1964, p. 26.
9. NICOLAU, CL., SIMION, Z., *Biofizica moleculară*, Ed. Științifică, București, 1968, p. 448.

A THEORETICAL MODEL OF COUPLING BIOCHEMICAL REACTIONS WITH THE PASSIVE DIFFUSION THROUGH A CELLULAR MEMBRANE

SUMMARY

A theoretical model of coupling biochemical reactions with the phenomenon of passive diffusion through cellular membranes is presented. This coupling may occur in cells bathed by fluid flows (e.g. blood). The conditions under which such a coupling can take place are discussed. An experimental checking of the theoretical model predictions is suggested.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 2, 191–195, (1971)

ZAHARURILE HIDROSOLUBILE REDUCĂTOARE ELIBERATE DIN BIOSTRUCTURA UNOR FRUNZE SUB ACȚIUNEA 2,4-DINITROFENOLULUI ȘI A AZIDEI DE SODIU

MARIA RABEGA.

Rezumat. Prin introducerea în țesuturile vegetale vii a 2,4-dinitrofenolului și a azidei de sodiu se eliberează din biostructura destrămată parțial și zaharuri hidrosolubile reducătoare.

După omorîrea reziduurilor rămase de la frunzele infiltrate cu inhibitori metabolici și cu apă (proba martor) prin stoarcerea acestora se obține o cantitate de zaharuri reducătoare mai mare din frunzele martor, decît din acelea care au fost tratate cu inhibitori metabolici.

Aceasta dovedește că biostructura sub acțiunea inhibitorilor metabolici utilizați, a eliberat o parte din zaharurile reducătoare, iar cantitatea rămasă fiind mai mică decît cea existentă în lichidul intracelular, s-a eliberat numai după omorîre din biostructura total destrămată.

S-a dovedit că în biostructura frunzelor sînt integrate zaharuri reducătoare și s-a arătat cantitatea în care acestea se găsesc în diferite plante [1]. De asemenea s-a dovedit experimental că prin introducerea 2,4-dinitrofenolului sau a azidei de sodiu în țesuturile vegetale vii, se eliberează din biostructură o parte din apa asimilată [2], [3] și o cantitate de substanțe hidrosolubile [4], ca urmare a destrămării parțiale a biostructurii sub acțiunea inhibitorilor folosiți.

În lucrarea de față s-a urmărit, în primul rînd, să se dovedească existența zaharurilor reducătoare printre substanțele eliberate din biostructură, sub acțiunea 2, 4-dinitrofenolului și a azidei de sodiu.

În al doilea rînd, s-a urmărit să se stabilească în ce raport se află cantitatea zaharurilor reducătoare din biostructură, față de cea existentă în lichidul intracelular. Pentru aceasta s-au măsurat cantitățile de sucuri obținute prin stoarcere din țesuturile vegetale proaspete, tratate cu inhibitorii menționați, cît și cantitățile sucurilor obținute după omorîrea reziduurilor, determinîndu-se apoi concentrația în zaharuri a acestor sucuri, față de probele martor.

Material și metodă de lucru

S-au folosit frunze de plantule de porumb (H.S. 301) și frunze de plantule de grîu (Triumph), în vîrstă de 14 — 16 zile, crescute în condiții de seră. Soluțiile apoase de 2,4 - dinitrofenol și azidă de sodiu, de concen-

trațiile 10^{-3} M și 10^{-2} M, au fost introduse în frunze prin metoda vacuum-infiltrației [5], folosind o cantitate de 50 g frunze. În frunzele folosite ca martor s-a introdus în aceleași condiții, în locul soluțiilor apoase de inhibitori, apă distilată. După 30 minute de infiltrare, frunzele șterse prin tamponare cu hîrtie de filtru se storceau la o presă de laborator tip Hafico, la presiunea de 150 atm.

Omorîrea reziduurilor rămase după stoarcerea frunzelor proaspete s-a realizat prin ținerea lor într-o atmosferă cu cloroform, timp de 24 ore.

Sucurile obținute se măsurau cu cilindrul gradat, iar după centrifugarea lor la 3 000 ture/minut se determina concentrația în zaharuri hidrosolubile reducătoare, după metoda Somogyi-Nelson [6], [7]. Citirile s-au făcut la spectrocolorimetrul Spekol, model Carl Zeiss Jena, iar rezultatele s-au calculat după o curbă etalon determinată cu o soluție standard de glucoză p.a.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Din tabela 1 se constată că frunzele de porumb tratate cu 2,4-dinitrofenol sau cu azidă de sodiu eliberează o cantitate de zaharuri hidrosolubile reducătoare cam de trei ori mai mare în cazul utilizării 2,4-dinitrofenolului și cam de patru ori mai mare în cazul azidei de sodiu, față de cantitatea obținută din frunzele martor. Aceste diferențe se explică prin eliberarea din biostructura supusă agenților de destrămare utilizați a unei cantități din zaharurile reducătoare, care se adaugă la cantitatea aflată inițial în lichidul intracelular (sucul martor).

Dacă se cercetează datele din tabela 2, se constată că după omorîrea cu cloroform a reziduurilor rămase, sucul obținut din reziduul frunzelor martor conține o cantitate de zaharuri reducătoare cam de două ori mai mare față de cea găsită prin stoarcerea reziduului rămas de la

Tabela 1

Cantitatea de suc (ml) și cantitatea de zaharuri hidrosolubile reducătoare (mg) obținută prin stoarcerea la 150 atm. a probelor de cîte 50 g frunze de porumb, infiltrate prin vacuum cu soluții de 2,4-dinitrofenol (D.N.P.) și de azidă de sodiu (NaN_3) de conc. 10^{-3} M, respectiv 10^{-2} M față de proba martor infiltrată cu apă.

Suc, ml			Concentrația în zaharuri hidrosolubile reducătoare, în mg/100 ml.			Cantitatea de zaharuri hidrosolubile reducătoare (mg) din sucul obținut prin stoarcere		
Martor	D.N.P.	NaN_3	Martor	D.N.P.	NaN_3	Martor	D.N.P.	NaN_3
19	33	38	9,7	15,3	18,4	1,84	5,05	6,99
19	34	35	9,9	15,1	19,3	1,88	5,13	6,76
20	31	34	9,5	16,2	20,0	1,90	5,02	6,80
15	31	34	11,2	16,7	20,2	1,68	5,18	6,87
17	30	35	10,5	17,0	19,7	1,79	5,10	6,90
18	29	37	10,7	17,1	18,8	1,93	4,95	6,96
16	32	35	11,0	16,0	19,5	1,76	5,12	6,83
17	31	37	10,3	16,4	18,6	1,75	5,08	6,88
15	32	38	11,4	15,8	18,2	1,71	5,06	6,92
18	30	36	10,1	16,9	19,1	1,82	5,07	6,88

Tabela 2

Cantitatea de suc (ml) şi cantitatea de zaharuri hidrosolubile reducătoare (mg) obţinută din reziduurile rămase după stoarcerea celor 50 g frunze proaspete de porumb infiltrate prin vacuum cu apă (proba martor) şi cu soluţii de 2,4-dinitrofenol (D.N.P.) şi de azidă de sodiu (NaN_3) după prealabila omorire cu cloroform timp de 24 ore

Suc, ml			Concentraţia în zaharuri hidrosolubile reducătoare în mg/100 ml			Cantitatea de zaharuri hidrosolubile reducătoare (mg) găsită în sucul obţinut prin stoarcere		
Martor	D.N.P.	NaN_3	Martor	D.N.P.	NaN_3	Martor	D.N.P.	NaN_3
25	12	14	70,0	59,0	47,0	17,50	7,08	6,58
26	12	14	68,0	60,5	48,5	17,68	7,26	6,79
26	14	13	69,0	55,0	49,5	17,94	7,70	6,44
23	15	13	76,5	53,5	50,5	17,60	8,03	6,57
24	15	12	74,5	52,5	52,5	17,84	7,88	6,30
23	13	12	75,5	56,5	53,5	17,37	7,35	6,42
24	13	12	72,5	58,0	55,0	17,40	7,54	6,60
24	12	12	73,5	60,0	54,5	17,64	7,20	6,54
24	14	13	72,0	56,0	50,0	17,28	7,84	6,50
23	13	11	76,0	57,0	56,0	17,48	7,41	6,16

frunzele infiltrate cu 2,4-dinitrofenol şi cam de trei ori mai mare în cazul reziduului frunzelor infiltrate cu azidă de sodiu. Aceste diferenţe se explică prin acţiunea pe care inhibitorii metabolici o exercită asupra ţesutului vegetal viu : o parte din componentele hidrosolubile integrate în biostructură , printre care şi zaharurile reducătoare, eliberîndu-se o dată cu destrămarea parţială a acesteia, provocată de 2,4-dinitrofenol şi de azida de sodiu, se elimină cu sucul stors înainte de omorîrea reziduurilor, astfel că, după omorîrea acestora , aşadar după destrămarea totală a restului de biostructură care a mai rămas, cantitatea de zaharuri reducătoare ce se eliberează acum nu poate fi decît mai mică decît cea obţinută din reziduurile frunzelor martor.

Constatări asemănătoare se desprind şi din examinarea datelor cuprinse în tabelele 3 şi 4.

Tabela 3

Cantitatea de suc (ml) şi cantitatea de zaharuri hidrosolubile reducătoare (mg) obţinută prin stoarcerea la 150 atm. a probelor de cîte 50 g frunze de grîu, infiltrate prin vacuum cu soluţii de 2,4-dinitrofenol (D.N.P.) şi de azidă de sodiu (NaN_3) de conc. 10^{-3}M, respectiv 10^{-2}M faţă de proba martor infiltrată cu apă.

Suc, ml			Concetraţia în zaharuri hidrosolubile reducătoare în mg/100 ml			Cantitatea de zaharuri hidrosolubile reducătoare (mg) găsită în sucul obţinut prin stoarcere		
Martor	D.N.P.	NaN_3	Martor	D.N.P.	NaN_3	Martor	D.N.P.	NaN_3
18	33	30	5,8	17,1	19,3	1,04	5,64	5,79
19	32	35	5,6	17,5	17,1	1,06	5,60	5,99
21	33	34	5,1	16,7	17,5	1,07	5,51	5,95
18	35	35	6,0	16,1	17,0	1,08	5,64	5,95
21	37	35	4,9	15,3	17,3	1,03	5,66	6,06
20	33	31	5,3	16,9	18,9	1,06	5,58	5,87
18	32	33	5,7	17,3	18,2	1,03	5,54	6,01
18	33	33	5,9	17,0	18,0	1,06	5,61	5,94
17	34	31	6,1	16,4	19,1	1,04	5,58	5,92
17	35	32	6,2	16,2	18,8	1,05	5,67	6,02

Tabela 4

Cantitatea de suc (ml) şi cantitatea de zaharuri hidrosolubile reducătoare (mg) obţinută din reziduurile rămase după stoarcerea celor 50 g frunze de grîu infiltrate prin vacuum cu apă (proba martor) şi cu soluţii de 2,4-dinitrofenol (D.N.P.) şi de azidă de sodiu (NaN_3) după prealabila omorîre cu cloroform timp de 24 ore.

Suc, ml			Concentraţia în zaharuri hidrosolubile reducătoare în mg/100 ml			Cantitatea de zaharuri hidrosolubile reducătoare (mg) găsită în sucul obţinut prin stoarcere		
Martor	D.N.P.	NaN_3	Martor	D.N.P.	NaN_3	Martor	D.N.P.	NaN_3
26	17	17	114,5	101	95,5	29,77	17,17	16,24
26	19	19	112,5	95,5	91,0	29,25	18,15	17,29
27	19	19	110,0	91,0	90,0	29,70	17,29	17,10
27	17	19	111,0	104,0	92,0	29,97	17,60	17,48
29	18	18	106,0	97,5	93,0	30,60	17,55	16,74
29	18	17	107,0	96,5	96,5	30,89	17,37	16,41
28	17	16	108,0	101,0	97,5	30,24	17,09	15,60
28	17	18	109,0	102,0	96,0	30,52	17,34	17,28
29	17	18	106,0	100,0	91,0	30,60	17,00	16,38
28	18	16	108,0	98,5	98,5	30,10	17,73	15,76

CONCLUZII

Rezultatele obţinute, interpretate în lumina teoriei biostructurale duc la următoarele concluzii :

— În frunzele de porumb şi grîu, cantitatea de zaharuri reducătoare care se găseşte în biostructură este mai mare decît cea care se găseşte în lichidul intracelular.

— 2,4 -dinitrofenol şi azida de sodiu, utilizaţi în concentraţii ce nu provoacă moartea frunzelor eliberează o parte din cantitatea de zaharuri reducătoare cuprinsă în biostructură.

— Prin omorîrea reziduurilor cu cloroform se pune în libertate şi cantitatea rămasă în constituţia biostructurii, ca urmare a destrămării sale totale.

Prezentată la redacţie la 4 noiembrie 1970

Catedra de biochimie
Facultatea de biologie
Universitatea Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. E. Macovschi, C. Mușolan, Rev. roum. Biochim., **6**, 89 (1969).
2. E. Macovschi, V. Frunzeti, St. cerc. biochim., **12**, 19 (1969)
3. E. Macovschi, M. Rabega; St. cerc. biochim., **13**, 219 (1970).
4. E. Macovschi, V. Frunzeti, St. cerc. biochim., **12**, 115 (1969).
5. A. N. Belozerskii, N. I. Proskuriakov, *Prakticeskoe rukovodstvo po biohimii rastenii.* Gosudarstvennoe izdatelstvo Sovetskaia Nauka Moskva, 293 (1951).
6. M. I. Somogyi, J. Biol. Chem., **160**, 61 (1945).
7. N. Nelson, J. Biol. Chem., **153**, 373 (1944).

HYDROSOLUBLE REDUCING SUGARS RELEASED FROM THE BIOSTRUCTURE OF CERTAIN LEAVES UNDER THE ACTION OF 2,4-DINITROPHENOL AND NATRIUM AZIDE

SUMMARY

By introducing in living vegetable tissues 2,4-dinitrophenol and natrium azide, hydrosoluble reducing sugars are released from the partially disintegrated biostructure.

By squeezing killed residuums left from metabolic inhibitor and water infiltrated leaves (witness), larger amounts of reducing sugars are obtained from witness leaves, than from those which have been treated with metabolic inhibitors.

This proves that under the action of metabolic inhibitors the biostructure has released only a part of reducing sugars; the amount left being lower than that existing in the intracellular liquid is released from the entirely disintegrated biostructure only after death.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 2, 197–201 (1971)

COMPORTAREA MALAT DEHIDROGENAZELOR DIN MUȘCHII NETEZI DE DIFERITE VERTEBRATE LA VARIAȚIA pH-ULUI ȘI LA DENATURARE TERMICĂ ȘI CU UREE*)

M. ȘERBAN și D. COTARIU

Rezumat. S-a cercetat activitatea specifică malat dehidrogenazică din mușchii netezi de vertebrate în funcție de pH și în urma inhibiției prin temperatură și diferite concentrații de uree. Comportarea enzimei atestă existența unei variabilități specie-specifice a proprietăților ei moleculare. S-a stabilit, de asemenea, că, comportarea, față de factorii menționați a enzimei din mușchiul neted diferă de aceia a enzimei din mușchiul striat al aceleiași specii. Se discută semnificația rezultatelor obținute.

În lucrări anterioare [1], [2], s-a semnalat comportarea malat dehidrogenazelor din creier și mușchi striat de diferite vertebrate la modificarea pH-ului și la inhibiția prin temperatură și uree. Cu această ocazie, s-a arătat că unele din proprietățile protein-enzimei menționate prezintă deosebiri apreciabile, care pot fi corelate cu poziția taxonomică a speciilor investigate. Avînd în vedere că mușchiul neted posedă anumite caracteristici funcționale bazate pe diferențieri ale unor componente biochimice și, foarte probabil, protein-enzimatice, ne-am propus extinderea, cercetărilor noastre și la acest tip de mușchi. În lucrarea de față se prezintă, deci, rezultatele obținute în studiul comparativ, la mai multe specii de vertebrate, al efectului pH-ului și al denaturării prin temperatură și uree asupra malat dehidrogenazelor din mușchiul neted.

MATERIAL ȘI METODE

Experiențele s-au făcut pe mușchi gastric (neted), provenind de la cîteva specii de vertebrate, și anume: broască, șarpe, șopîrlă, porumbel, rață, șobolan, iepure și arici. Stomacul, prelevat imediat după sacrificarea animalelor, era curățat și spălat de mai multe ori cu soluție fiziologică rece; mucoasa stomacală era îndepărtată cu grijă, pentru a se evita lezarea sau excitarea țesutului muscular. Extracția malat dehidrogenazelor s-a făcut în apă distilată, raportul de extracție fiind de trei părți extractant la o parte țesut [4]. După 90 min de extracție, omogenatele

*) Asistența tehnică A. Radu.

obținute la rece erau centrifugate timp de 10 min la 800 × g; supernatantele erau congelate în zăpadă carbonică și decongelate de 2 — 3 ori în vederea spargerii membranelor mitocondriale, apoi recentrifugate 40 min la 22 000 × g (+2°C). Concentrațiile proteice au variat între 1,2 — 1,5 g la 100 ml extract. Activitatea malat dehidrogenazei a fost determinată spectrofotometric [3], urmărind scăderea densității optice la 340 mμ, într-un mediu de reacție conținînd : 2,7 ml tampon TRIS-HCl 0,2 M, 0,1 ml oxalacetat de sodiu $7{,}6.10^{-2}$M, 0,1 ml $NADH_2$ $1{,}5.10^{-3}$ M și 0,1 ml enzimă. Concentrația soluției proteice conținînd enzima a fost ajustată la o valoare convenabilă, prin diluare în raportul de 1/100. Pentru calculul activității enzimatice s-au folosit scăderile de densitate optică între 30 — 45 s de la începutul reacției. Unitățile enzimatice astfel calculate s-au raportat la 1 mg proteină, obținîndu-se în felul acesta activitățile specifice.

Efectul pH-ului s-a urmărit în medii de reacție conținînd tampon TRIS—HCl 0,2 M, cu următoarele valori de pH : 7,4 ; 7,8 ; 8,2 respectiv 8,6. Pentru fiecare din valorile menționate s-au preparat soluții de substrat (oxalacetat de sodiu) și $NADH_2$ în tampon TRIS-HCl 0,2 M de pH-ul respectiv.

Efectul temperaturii asupra vitezei de inactivare a enzimei s-a urmărit la 55 și 65°C. Soluțiile diluate de enzimă au fost menținute în ultratermostat Höppler timp de 60 min, după care li s-a determinat activitatea enzimatică malat dehidrogenazică, în comparație cu soluțiile martor, menținute același interval la + 4°C.

Acțiunea ureei s-a urmărit la trei molarități diferite, și anume :. 2 M, 6 M și 8 M. După un contact de 30 min cu ureea, extractele proteice s-au diluat în proporție de 1/100 și s-a determinat activitatea enzimatică malat dehidrogenazică, în comparație cu extractele proteice diluate, martor

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Activitatea în funcție de pH a malat dehidrogenazelor din mușchii netezi, la diferite specii de vertebrate, este reprezentată în figura 1. După cum reiese din figură, maximul de activitate în funcție de pH prezintă variații de specie, care în unele cazuri pot fi grupate pe clase de vertebrate. Se remarcă astfel, că la vertebratele inferioare (amfibii și reptile) activitatea optimă este situată la pH 7,8, pe cînd la cele superioare (păsări și mamifere) ea oscilează, în funcție de specie, între pH 7,8 și 8,6. Apare astfel că, la acestea din urmă, variabilitatea de specie este foarte pronunțată. Dacă în ceea ce privește maximul de activitate se poate face o distincție între formele inferioare și cele superioare, alura curbelor de activitate în funcție de pH manifestă o apreciabilă specificitate de specie. Această comportare poate fi atribuită schimbărilor diferite, caracteristice fiecărei proteine, în starea grupărilor ionizabile, pe măsura modificării pH-ului.

Trebuie menționat, de asemenea, că valoarea de pH optimă pentru activitatea malat dehidrogenazică din mușchii netezi de diferite specii de vertebrate se deosebește, în general, de valoarea corespunzătoare la mușchii striați ai aceleiași specii [2]. Acest fapt demonstrează că, cel puțin din

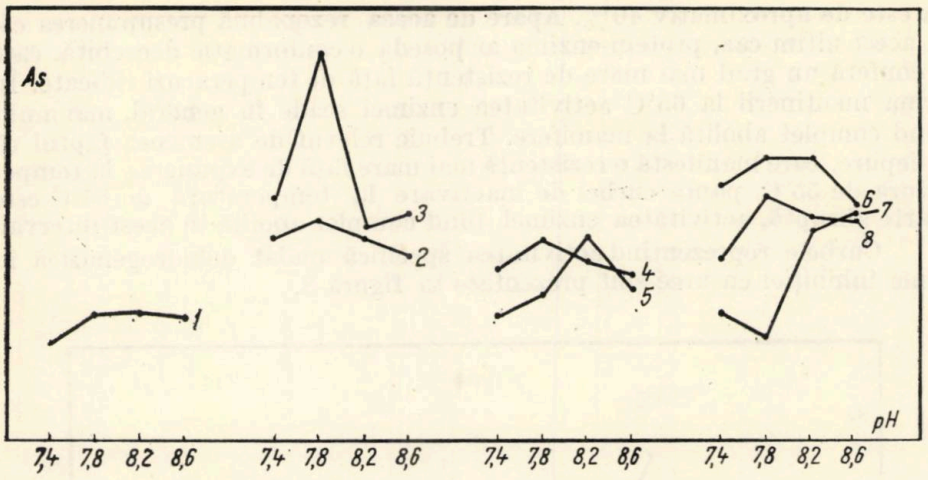


Fig. 1. — Activitatea malat dehidrogenazei din mușchiul neted în funcție de pH, la diferite vertebrate.

1 — broască; *2* — șarpe; *3* — șopîrlă; 4 — porumbel; *5* — rață; 6 — iepure; 7 — arici; *8* — șobolan. *As* = activitate specifică.

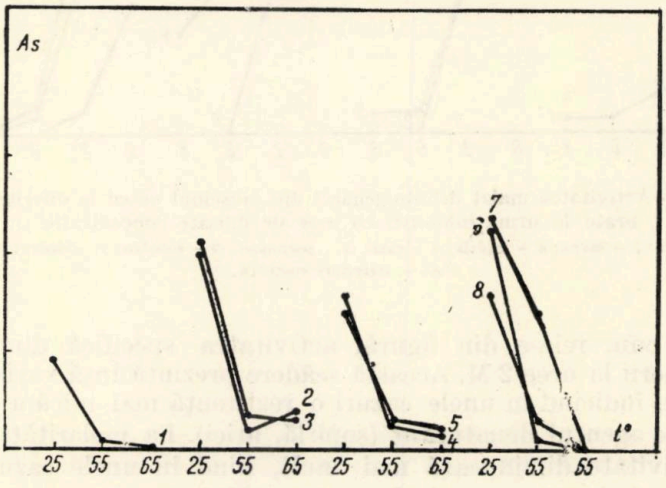


Fig. 2. — Activitatea malat dehidrogenazei din mușchiul neted la diferite vertebrate în urma inhibiției prin temperatură.

1 — broască; *2* — șarpe; *3* — șopîrlă; *4* — rață; *5* — porumbel; *6* — șobolan; *7* — iepure; *8* — arici. *As* = activitate specifică.

anumite puncte de vedere, configurația moleculei protein-enzimei este diferită la cele două tipuri de mușchi.

În figura 2 sînt prezentate curbele de activitate specifică malat dehidrogenazică din mușchii netezi de diferite vertebrate, în urma expunerii enzimei la acțiunea căldurii. După cum reiese din figură, malat dehidrogenaza suferă o apreciabilă diminuare a activității în urma expunerii la 55° C. Această scădere reprezintă 80—95% din activitatea normală (martor), cu excepția enzimei din mușchii netezi de iepure, la care

ea este de aproximativ 40%. Apare de aceea rezonabilă presupunerea că, în acest ultim caz, protein-enzima ar poseda o conformaţie deosebită, care îi conferă un grad mai mare de rezistenţă faţă de temperaturi ridicate. În urma menţinerii la 65°C activitatea enzimei scade în general, mai mult, fiind complet abolită la mamifere. Trebuie relevat de asemenea faptul că la iepure, care manifestă o rezistenţă mai mare faţă de expunerea la temperatura de 55°C, panta curbei de inactivare la temperatura de 65°C este foarte abruptă, activitatea enzimei fiind complet abolită în acest interval.

Curbele reprezentînd activitatea specifică malat dehidrogenazică în urma inhibiţiei cu uree sînt prezentate în figura 3.

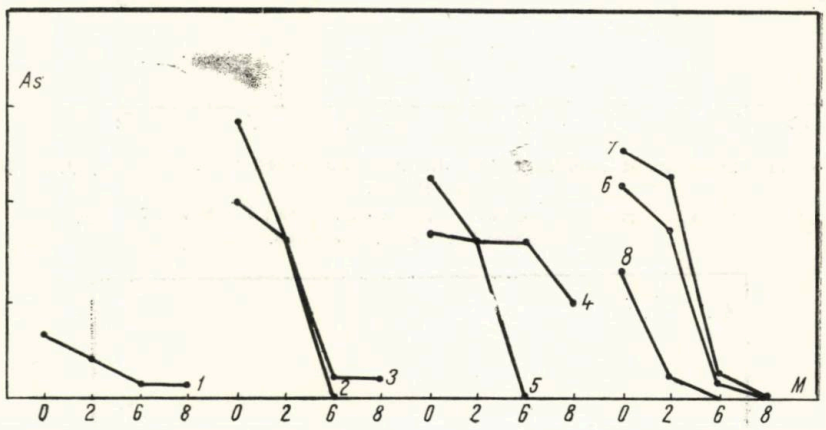


Fig. 3. — Activitatea malat dehidrogenazei din muşchiul neted la diferite vertebrate în urma inhibiţiei cu uree de diferite concentraţii.
1 — broască; *2* — şarpe; *3* — şopîrlă; *4* — raţă; *5* — porumbel; *6* — şobolan; *7* — iepure; *8* — arici.
As = activitate specifică.

După cum reiese din figură, activitatea specifică diminuează în urma expunerii la uree 2 M. Această scădere prezintă însă variaţii în funcţie de specie, indicînd în unele cazuri o rezistenţă mai mică a protein-enzimei faţă de agentul denaturant (şopîrlă, arici). La molarităţi mai mari, această activitate diminuează mai mult, fiind în unele cazuri complet abolită, chiar de la concentraţia de uree de 6M. Ca o caracteristică generală, alura curbelor de inactivare a activităţii specifice malat dehidrogenazice prin expunerea la concentraţii diferite de uree manifestă un grad mare de diversitate, fapt ce sugerează existenţa unei variabilităţi de specie marcate a anumitor proprietăţi moleculare ale protein-enzimei. Este de asemenea demn de relevat faptul că comportarea malat dehidrogenazelor din muşchii netezi de diferite vertebrate la inhibiţia prin uree este net diferită de aceea a enzimei din muşchii striaţi ai aceloraşi specii [2]. Din acest motiv, se poate afirma că malat dehidrogenaza, care catalizează acelaşi tip de reacţie în ambele forme de muşchi, deşi prezintă proprietăţi fizico-chimice comune [4], [5], posedă totuşi anumite caracteristici moleculare specifice, exprimate prin variaţia proprietăţilor catalitice.

CONCLUZII

— Malat dehidrogenaza din musculatura netedă de vertebrate prezintă o variabilitate de specie accentuată a maximului de activitate în funcţie de pH, evidenţiindu-se diferenţieri nete între formele superioare şi inferioare.

— Malat dehidrogenaza din musculatura netedă suferă o apreciabilă diminuare a activităţii mergînd pînă la totala ei abolire, în urma expunerii la temperaturi de 55 şi 65°C. Alura curbelor de inactivare prezintă totuşi anumite particularităţi de specie.

— Alura curbelor de inactivare a activităţii specifice malat dehidrogenazice în urma expunerii la diferite concentraţii de uree prezintă o pronunţată variabilitate de specie.

— Comportarea malat dehidrogenazei din muşchii netezi de diferite vertebrate faţă de modificarea pH-ului şi după denaturarea prin temperatură sau cu uree atestă existenţa unor deosebiri ale proprietăţilor moleculare ale protein-enzimei.

— Malat dehidrogenazele din muşchiul striat şi neted al aceleiaşi specii posedă proprietăţi fizico-chimice comune, dar diferă în anumite proprietăţi catalitice, fapt ce indică existenţa unor caracteristici moleculare specifice.

Prezentat la redacţie la 3 octombrie 1970

Institutul de biochimie
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. M. Şerban, St. cerc. biochim., **14**, 85 (1971).
2. D. Cotariu, Rev. roum. Biol., série de Zool., **16**, (1971).
3. S. Ochoa, în *Methods in Enzymology*, vol. I, Ed. S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Acad. Press, New-York, 735.
4. M. Şerban, D. Cotariu, Rev. roum. Biol., série de Zool., **15**, 181 (1970).
5. M. Şerban, D. Cotariu, St. cerc. biochim., **14**, 93 (1971).

THE BEHAVIOUR OF SMOOTH MUSCLE MALATE DEHYDROGENASE IN DIFFERENT VERTEBRATES AGAINST VARIATIONS OF pH AND AFTER TEMPERATURE AND UREA INHIBITION

SUMMARY

The specific malate dehydrogenase activity in smooth muscles of vertebrates was studied, depending on pH and after inhibition by temperature or different concentrations of urea. The enzyme behaviour suggests the existence of a species-specific variability in its molecular properties. It was also established that the behaviour against the above mentioned factors of smooth muscle enzyme differ from those of the striated muscle enzyme in the same species. The significance of results is discussed.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 2, 203–209 (1971)

EFECTUL CORTIZOLULUI ASUPRA LACTAT DEHIDROGENAZEI ŞI A IZOENZIMELOR SALE DIN FICAT ŞI SER ÎN INTOXICAŢIA EXPERIMENTALĂ ACUTĂ ŞI CRONICĂ CU TETRACLORURĂ DE CARBON

MARGARETA ŞERBAN şi MIHAIL ŞERBAN

Rezumat. Sînt prezentate modificările induse de intoxicaţia experimentală de tip acut şi cronic cu tetraclorură de carbon, precum şi efectul administrării de cortizol asupra activităţii lactat dehidrogenazei şi a izoenzimelor sale din ficat şi ser. Cortizolul tinde să restabilească valorile normale ale activităţii LDH hepatice, valori depresate sub acţiunea tetraclorurii de carbon. Activitatea LDH serice este semnificativ crescută în intoxicaţia cu tetraclorură de carbon şi sub acţiunea cortizolului.

În lucrări anterioare [1], [2] am subliniat că atît activitatea lactat dehidrogenazei (LDH) cît şi izoenzimele sale sînt profund afectate în intoxicaţia experimentală hepatică, precum şi sub acţiunea unor inhibitori enzimatici specifici.

În continuarea acestor cercetări, pornind de la unele date referitoare la modificările activităţii enzimatice serice în diversele forme de hepatită tratate cu glucocorticoizi [3], ne-am propus să urmărim efectul administrării de cortizol (hidrocortizon) asupra lactat dehidrogenazei şi a izoenzimelor sale din ţesutul hepatic, în intoxicaţia acută şi cronică. Am ales ca indicator al lezării ficatului LDH, ca fiind unul din cele mai folosite teste în urmărirea patologiei hepatice umane, deşi hormonii glucocorticoizi nu acţionează direct asupra activităţii enzimelor glicolitice bidirecţionale [4]. Pe de altă parte, LDH poate constitui un indice în aprecierea alterării metabolismului energetic glicolitic la nivelul ficatului.

Pentru a se putea stabili dacă, şi în ce măsură, efectele cortizolului, constatate la nivelul organului, se reflectă şi la nivelul serului, am urmărit acţiunea hormonului şi asupra LDH serice şi a izoenzimelor sale.

MATERIAL ŞI METODE

Determinările s-au efectuat pe ţesut hepatic provenit de la un număr. de 69 şobolani albi, masculi (rasa Wistar), în greutate medie de 225 g. Aceştia au fost împărţiţi în două variante (experiment acut şi experiment

cronic) de cîte patru loturi fiecare, realizîndu-se următoarele modele experimentale :

Experiment de tip acut. La un prim lot s-a administrat intraperitoneal o soluție de tetraclorură de carbon 50% în ulei de floarea soarelui, în doză de 0,2 ml/100 g corp, timp de două zile. La un al doilea lot s-a administrat, timp de două zile, 2,5 mg cortizol + 0,2 ml soluție uleioasă de tetraclorură de carbon/100 g corp. Al treilea lot a fost tratat numai cu cortizol, în doză de 2,5 mg/100 g corp, timp de două zile. În fine, cel de-al patrulea lot a servit ca referință, animalelor respective administrîndu-li-se intraperitoneal ulei de floarea sorelui, 0,2 ml/100 g corp, în același ritm.

Experiment de tip cronic. La primul lot de animale s-a administrat cîte 0,2 ml/100 g corp dintr-o soluție uleioasă de tetraclorură de carbon 50%, sub formă de injecții intraperitoneale, la interval de 2—3 zile, în total 14 injecții. Un al doilea lot a fost tratat în mod asemănător, cu deosebirea că după încetarea tratamentului s-a administrat în continuare cortizol în doze de 2,5 mg/100 g corp, sub formă de injecții intraperitoneale, la interval de 2 zile, în total 15 injecții. Animalele din cel de-al treilea lot au fost tratate numai cu cortizol, în doză de 2,5 mg/100 g corp, în același ritm ca al doilea lot. În fine, lotului martor i s-a administrat numai ulei de floarea soarelui, cîte 0,2 ml/100 g corp.

Animalele au fost sacrificate prin decapitare, la 24 ore după ultima injecție. Țesutul hepatic a fost prelevat imediat și cîntărit. Extracția proteinelor s-a efectuat după omogenizarea țesutului, folosind ca mediu de extracție tamponul TRIS-HCl de pH 7,6. Raportul de extracție a fost de o parte greutate țesut și cinci părți soluție de extractant. După menținerea omogenatului timp de 2 ore la + 4°C, acesta a fost centrifugat 30 min la 22 000 × g (+ 4°C). Concentrația proteică determinată a variat între limitele de 1,80—2,40 g/100 ml extract.

Analiza electroforetică pentru punerea în evidență a izoenzimelor LDH s-a efectuat în gel de agar, în condițiile menționate anterior [5]. Activitatea enzimatică LDH s-a determinat spectrofotometric [5] și a fost exprimată în unități enzimatice per mg țesut umed. Evaluarea cantitativă a tipurilor de izoenzime LDH s-a realizat prin prelucrarea datelor densitometrice și planimetrice. Rezultatele obținute au fost prelucrate statistic.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Din datele obținute rezultă, ca o caracteristică generală, faptul că efectul cortizolului, atît în experimentul de tip acut, cît și în cel de tip cronic, se manifestă printr-o tendință evidentă de restabilire a pragului normal al activității LDH totale din ficat, a cărei valoare este profund diminuată în intoxicația hepatică. Se constată, totuși, și unele deosebiri în gradul de acțiune a cortizolului asupra activității LDH și a izoenzimelor respective, în funcție de modelul experimental realizat — acut sau cronic.

După cum reiese din tabela 1, în intoxicația cu tetraclorură de carbon, care oferă posibilitatea realizării unei afecțiuni hepatice asemănătoare în multe privințe [6], [7] cu cea de tip uman, se produce o diminuare evidentă — statistic asigurată — a activității LDH totale, în raport cu lo-

turile de referință. Scăderea acestei activități este însă mult mai pronunțată în experimentul de tip acut decît în cel de tip cronic. Faptul acesta ar putea fi atribuit alterărilor biochimice produse de către acțiunea toxicului în acest experiment și, într-o mai mică măsură, deversării enzimei în to-

Tabela 1

Activitatea lactat dehidrogenazei (LDH) din ficat în intoxicație acută și cronică

Loturi	Nr. de animale	Experiment acut — u LDH/mg țesut umed	Loturi	Nr. de animale	Experiment cronic — u LDH/mg țesut umed
1. Tetraclorură de carbon	6	153±8,2	1. Tetraclorură de carbon	6	301±65
2. Tetraclorură de carbon + cortizol	8	356±38	2. Tetraclorură de carbon + cortizol	9	449±17
3. Cortizol	14	446±23	3. Cortizol	8	268±13
4. Lot referință	13	444±11	4. Lot referință	5	449±43

rentul sanguin. Într-adevăr, după cum confirmă și rezultatele examenelor histologice, gradul de lezare a parenchimului hepatic este mai puțin extins în experimentul de tip acut decît în cel de tip cronic, încît scăderea masivă a valorii activității LDH, înregistrată în primul caz, nu constituie – decît poate numai parțial — o consecință a lezării parenchimului hepatic. În experimentul cronic, scăderea activității LDH este moderată în raport cu lotul martor, deși gradul de lezare a organului este mult mai extins; în acest caz, enzima este deversată în sînge într-o anumită proporție, ca rezultat al alterării profunde a țesutului hepatic. Aceasta se corelează cu constatarea că, în general, în stările de ciroză la om activitatea LDH serice nu depășește cu mult valorile normale [3].

Aceste modificări ale activității totale LDH, determinate de acțiunea tetraclorurii de carbon atît în experiment acut cît și în cel cronic, sînt influențate, la rîndul lor, de efectul administrării de cortizol. Astfel, din tabela 1 reiese că în ambele cazuri cortizolul induce o creștere a activității enzimatice din ficat, activitate depresată inițial de acțiunea toxicului. Această creștere tinde să restabilească valoarea normală a activității LDH. Se constată însă că augmentarea activității LDH sub influența cortizolului este mai mare în cazul intoxicației acute a țesutului hepatic decît în cazul celei cronice.

Efectul pozitiv al cortizolului poate fi încadrat în anumite mecanisme de compensare, care se pot produce la nivelul țesutului hepatic lezat. Se cunoaște faptul că glucocorticoizii acționează asupra proteinenzimelor fie în sensul reglării activității lor [8], [9], fie în sensul influențării sintezei „de novo" a acestora [10]—[13]. În acest sens, nu pare a fi exclusă deci acțiunea inductoare a cortizolului asupra activității enzimatice urmărite și care este afectată de acțiunea tetraclorurii de carbon.

Pe de altă parte, cercetările clinice și experimentale efectuate pînă în prezent nu permit elucidarea mecanismului prin care glucocorticoizii

împiedică eliberarea enzimelor din hepatocit. În cadrul reacţiilor celulare induse de agenţi toxici se produc alterări ale metabolismului local, precum şi tulburări de permeabilitate, traduse sub forma de defecte parcelare ale membranelor celulare. În acest context, nu este exclus ca cortizolul să contribuie la activarea procesului de refacere a membranei, influenţînd favorabil funcţia selectivă şi concentrantă a acesteia.

O anumită deosebire cu privire la nivelul activităţii LDH din ficat se constată şi prin simpla administrare a cortizolului. Din tabela 1 se observă că în experimentul acut, de scurtă durată, cortizolul nu modifică valoarea normală a activităţii enzimatice, spre deosebire de experimentul cronic, unde această valoare scade. Faptul acesta poate fi interpretat în sensul că în celula hepatică normală cortizolul, după o administrare mai îndelungată, corespunzătoare unui experiment cronic, favorizează depunerea glicogenului, prin creşterea cantităţii de glucozo-6-fosfat, inductor pentru glicogen sintetază.

Anumite deosebiri, în funcţie de tipul experimentului realizat, se semnalează şi la nivelul izoenzimelor LDH din ficat. Astfel, din tabela 2

Tabela 2

Repartiţia procentuală a izoenzimelor LDH din ficat în intoxicaţia acută şi cronică

Loturi	Experiment acut					Experiment cronic				
	LDH_1	LDH_2	LDH_3	LDH_4	LDH_5	LDH_1	LDH_2	LDH_3	LDH_4	LDH_5
1. Tetraclorură de carbon	0	0	3,0	10,5	86,5	6,6	7,8	10,5	12,6	62,5
2. Tetraclorură de carbon + cortizol	0	0	4,5	13,2	82,3	5,3	7,3	13,0	16,1	58,3
3. Cortizol	0	0,6	8,5	16,2	74,4	1,3	1,0	5,7	12,7	79,3
4. Lot referinţă	1,6	1,0	6,9	12,0	78,5	2,4	6,0	9,6	20,2	62,6

rezultă că intoxicaţia acută cu tetraclorură de carbon determină o scădere a activităţii tipurilor de izoenzime LDH_1 şi LDH_2, şi o creştere moderată a tipului parental LDH_5; dimpotrivă, în intoxicaţia cronică se semnalează o creştere a activităţii tipurilor LDH_1, mai ales, şi LDH_2, fapt pe care l-am explicat anterior [1], [2]. Cortizolul administrat ulterior acţiunii tetraclorurii de carbon nu modifică practic modelul izoenzimelor LDH, nici în experimentul de tip acut şi nici în cel de tip cronic, în comparaţie cu modelele determinate de acţiunea tetraclorurii de carbon în ambele variante (tabela 2). Este de notat, de asemenea, că administrarea de cortizol produce în ţesutul hepatic normal o scădere a activităţii izoenzimelor LDH_1 şi LDH_2, mai accentuată după o perioadă mai lungă de administrare, corespunzătoare unui experiment cronic.

Cortizolul exercită în intoxicaţia hepatică un anumit efect asupra activităţii LDH nu numai la nivelul organului, dar şi al serului. Din tabela 3, rezultă că administrarea de cortizol consecutiv acţiunii exercitate de tetraclorura de carbon asupra ţesutului hepatic determină în ser o creştere semnificativă a valorii activităţii LDH, atît în experimentul de tip acut cît şi în cel cronic. Se observă însă că această creştere este ceva mai mare în cazul

experimentului de tip acut. În comparație cu serul, efectul exercitat de cortizol asupra ficatului se manifestă, de asemenea, printr-o creștere a activității enzimatice LDH, activitate depresată inițial prin acțiunea toxicului; în cazul ficatului, această creștere tinde să restabilească valoarea normală a activității LDH, fără însă să o depășească.

Tabela 3

Valorile activității LDH serice în intoxicația experimentală hepatică acută și cronică

Loturi	Experiment acut		Experiment cronic	
	Număr de animale	u LDH/ml	Număr de animale	u LDH/ml
1. Tetraclorură de carbon + cortizol	8	4297±168	9	3536±374
2. Tetraclorură de carbon	6	1554±147	6	2657±130
3. Cortizol	14	1416±195	8	2067±80
4. Lot referință	13	2077± 89	5	1922±159

O deosebire între valorile activității LDH din ficat și ser se observă și în funcție de tipul intoxicației — acută sau cronică. Astfel, pe cînd în cazul țesutului hepatic, tetraclorura de carbon acționează în sensul diminuării activității LDH în ambele variante experimentale, în ser acțiunea toxicului se manifestă însă printr-o ușoară scădere a activității LDH în experiment de tip acut și printr-o ușoară creștere a ei în experiment de tip cronic (tabela 3). Faptul este explicabil, în sensul că intoxicația cronică provoacă o lezare mai extinsă a parenchimului hepatic, ceea ce determină o deversare a enzimei în circuitul sanguin; pe de altă parte, experimentul acut este de scurtă durată, creșteri ale activității LDH în ser înregistrîndu-se abia după a 3-a zi de la administrarea tetraclorurii de carbon [3].

Referitor la acțiunea cortizolului administrat animalelor sănătoase, se constată că în experimentul de tip acut hormonul nu modifică activitatea LDH hepatice, în timp ce, în același tip de experiment, activitatea LDH serice este ușor scăzută (tabela 3); dimpotrivă, în experimentul de tip cronic, activitatea LDH din ficat scade sub acțiunea cortizolului pe cînd, în același experiment, activitatea LDH serice nu este influențată. Aceste comportări reflectă probabil anumite mecanisme de compensare ce se realizează în cadrul organului [5], [6].

Modelele izoenzimelor LDH din ser prezintă unele modificări în raport cu loturile de referință, atît în intoxicația acută cît și în cea cronică, pe de o parte, precum și sub acțiunea cortizolului, pe de altă parte (tabela 4). În ambele experimente, tetraclorura de carbon produce o creștere a tipului parental de izoenzimă LDH_1. Acest fapt a fost constatat, de altfel, și în cazul ficatului, dar numai în experimentul cronic. Administrarea de cortizol animalelor intoxicate în prealabil, acut sau cronic, cu tetraclorură de carbon, determină de asemenea o creștere moderată a izoenzimei LDH_1 din ser. Și sub acest aspect există o analogie cu ficatul, în sensul că efectul cortizolului în intoxicația cronică produce o creștere a izoenzimei LDH_1, fapt care nu se observă în ficat, în experimentul de tip acut.

În fine, ca o remarcă generală, se constată că între intoxicaţia acută şi cea cronică nu se observă, la nivelul serului, diferenţe notabile în modelele izoenzimelor LDH, nici sub acţiunea toxicului, nici sub aceea a hormonului administrat. În ţesutul hepatic însă, asemenea diferenţe există, modelele izoenzimatice respective deosebindu-se între ele, în funcţie de intoxicaţia acută sau cronică.

Tabela 4

Repartiţia procentuală medie a activităţii izoenzimelor LDH serice în intoxicaţia experimentală hepatică acută şi cronică

Loturi	Experiment acut					Experiment cronic				
	LDH_1	LDH_2	LDH_3	LDH_4	LDH_5	LDH_1	LDH_2	LDH_3	LDH_4	LDH_5
1. Tetraclorură de carbon + cortizol	18,6	4,8	5,4	6,4	64,8	15,0	14,0	11,0	10,0	50,0
2. Tetraclorură de carbon	22,2	9,2	7,4	5,7	55,5	16,0	8,3	7,0	7,5	61,2
3. Cortizol	21,2	8,0	5,6	7,8	57,4	5,6	4,8	6,9	8,0	74,7
4. Lot referinţă	13,6	5,0	5,2	4,8	71,4	10,2	14,0	15,0	17,0	43,8

Din datele prezente rezultă, astfel, că cortizolul acţionează asupra lactat dehidrogenazei şi a izoenzimelor sale atît în ţesutul hepatic normal cît şi în cel lezat. Efectul său prezintă însă anumite particularităţi, în funcţie de tipul de intoxicaţie provocat — acută sau cronică. Modificările activităţii LDH şi ale modelului izoenzimatic respectiv induse de cortizol asupra ţesutului hepatic se reflectă, într-o anumită măsură, şi la nivelul serului.

CONCLUZII

— Cortizolul administrat în afecţiunile hepatice experimentale acute şi cronice tinde să restabilească valoarea normală a activităţii LDH, depresată sub acţiunea tetraclorurei de carbon.

— În experimentul acut, tetraclorura de carbon determină o scădere mult mai accentuată a activităţii LDH hepatice decît în experimentul cronic.

— Modelul izoenzimelor LDH din ţesutul hepatic se modifică atît în intoxicaţia cronică cu tetraclorură de carbon cît şi în cea acută în special la nivelul tipurilor de izoenzime LDH_1 şi LDH_2; cortizolul nu modifică semnificativ modelele izoenzimatice induse de acţiunea toxicului asupra ţesutului hepatic.

— Activitatea totală LDH este semnificativ crescută în serul şobolanilor intoxicaţi cu tetraclorură de carbon şi la care s-a administrat cortizol. Modelul izoenzimatic rămîne însă acelaşi cu cel normal.

Prezentat la redacţie la 17 septembrie 1970

Institutul de medicină internă
şi
Institutul de biochimie, Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. ȘERBAN, MARGARETA, Rev. roum. Med. Int., **8**, 6 (1971).
2. ȘERBAN, M., ȘERBAN, MARGARETA, Rev. roum. Biochim., **8**, 102 (1971).
3. AMELUNG, D., în Fermentdiagnostik Interner Erkrankungen, Ed. G. Thieme Verlag, Stuttgart 1964, p. 92.
4. WEBER, G., FISCHER, E. A., MENTENDIER, M. A., în *Advances in enzyme regulation*, Ed. G. Weber, Pergamon Press, **2**, 1 (1964).
5. ZAMFIRESCU-GHEORGHIU, M., ȘERBAN, M., VLĂDESCU, C., CHIRULESCU, Z., Rev. roum. Med. Int., *4*, 395 (1967).
6. BRODY, T. M., Ann. N. Y. Acad. Sci., **104**, 1065 (1963).
7. RECKNAGEL, R. O., Pharmacol. Rev., **19**, 145 (1967).
8. WEBER, G., Gastroenterology, **53**, 984 (1967).
9. YIELDING, K. L., TOMKINS, G. M., BITENSKY, M. W., Clin. Chem., **11**, 213 (1965).
10. GREENGARD, O., SMITH, M. A., ACS, G., J. Biol. Chem., **238**, 1548 (1963).
11. KENNEY, F. T., KULL, F. J., Proc. Nat. Acad. Sci., **50**, 493 (1963).
12. KENNEY, F. T., WICKS, W. D., J. Cell. Comp. Physiol. Suppl., **66**, 125 (1965).
13. AMARAL, L., MORIBER, L. G., HIMES, M., J. Cell Biol., **42**, 835 (1969).

THE EFFECT OF CORTISOL UPON LIVER AND SERUM LACTATE DEHYDROGENASE AND ITS ISOENZYMES DURING ACUTE AND CHRONICAL EXPERIMENTAL CARBON TETRACHLORIDE INTOXICATION

SUMMARY

Some changes induced by acute and chronical carbon tetrachloride experimental intoxication are reported, as well as the effect of cortisol administration upon activity of lactate dehydrogenase and its isoenzymes in liver and serum. Cortisol tends to restore normal values of liver LDH activity which were depressed under carbon tetrachloride action. Serum LDH activity is significantly increased after carbon tetrachloride intoxication and under cortisol action.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 2, 211 – 214 (1971)

CONȚINUTUL DE CAROTINOIDE AL BOABELOR UNOR HIBRIZI DE PORUMB ÎN COMPARAȚIE CU GENITORII LOR

F. ZETEA și C. BODEA

Rezumat. S-a determinat conținutul de carotinoide totale și carotinoide cu rol de provitamine A la 15 linii consangvinizate și la hibrizii lor cu soiul Galben timpuriu. Conținutul de provitamine A este un caracter mai variabil decît cel al celorlalte carotinoide, iar proporția lor manifestă o tendință de creștere la hibrizi.

Principalele carotinoide ale bobului de porumb sînt luteina și zeaxantina, dar valoarea biologică a porumbului depinde de conținutul în criptoxantină, α-carotină și β-carotină, care au rol de provitamine A.

Modificarea caracterelor biochimice ce survin în boabele de porumb în urma hibridării a format obiectul multor cercetări.

Hibrizii între soiuri realizează în prima generație un conținut de provitamine A mai scăzut decît al părinților, dar în generația a doua se manifestă o tendință de revenire la nivelul părinților [1], [2]. S-a constatat de asemenea că la hibrizii proveniți din forme parentale înrudite se obține o sporire relativ redusă a conținutului de carotinoide, și că unele linii parentale au o capacitate mai bună de transmitere la urmași fie a complexului carotinoidic total, fie a carotinoidelor cu rol de provitamine A [3].

În lucrări anterioare [4], [5] am studiat modificările conținutului bobului în aminoacizi și zeină. În lucrarea de față ne-am propus să determinăm conținutul de carotinoide la cîteva linii consangvinizate și hibrizii lor.

MATERIAL ȘI METODĂ

S-a determinat conținutul în carotinoide totale și cel de carotinoide cu rol de provitamine A din boabele de porumb, la 15 linii consangvinizate obținute din soiurile Galben timpuriu, Arieșan și din populații locale, precum și la hibrizii lor cu soiul Galben timpuriu (tabela 1). Materialul a fost produs la Baza experimentală a Institutului agronomic Cluj, în anul 1965, iar analizele au fost efectuate în perioada noiembrie 1968 – ianuarie 1969.

Pentru extragerea și cromatografierea carotinoidelor s-a utilizat metoda elaborată de Asociația Chimiștilor din agricultura S.U.A. și modi-

ficată de C. Bodea, M. Florescu şi V. Drugan [6]. Determinarea cantitativă a carotinoidelor s-a făcut cu ajutorul fotocolorimetrului FEK, utilizînd filtrele nr. 2 (albastru) şi nr. 4 (roşu).

Tabela 1

Liniile consangvinizate şi hibrizii lor cu soiul Galben timpuriu (7–9)

Linia-mamă	Hibridul	Linia-mamă	Hibridul	Linia-mamă	Hibridul
13–14	725	122	554	303–305	659
22–24	727	124–126	555	318–320	661
25–27	728	211–212	569	392	678
40–41	546	274–276	584	408–409	686
58–60	724	280–281	597	457	690

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Soiul Galben timpuriu, utilizat ca soi polenizator, are un conţinut de carotinoide totale şi de carotinoide cu rol de provitamine A superior atît aceluia al liniilor consangvinizate cît şi aceluia al hibrizilor (tabela 2).

Tabela 2

Conţinutul de carotinoide totale şi carotinoide cu rol de provitamine A al liniilor consangvinizate şi hibrizilor (mg/100 grame material uscat)

Linia-mamă	Hibridul	Carotinoide totale		Provitamine A	
		Linia-mamă	Hibridul	Linia-mamă	Hibridul
13–14	725	0,60	1,38	0,09	0,27
22–24	727	1,02	0,72	0,13	0,08
25–27	728	1,04	1,00	0,04	0,09
40–41	546	1,13	1,00	0,51	0,09
58–60	724	1,14	1,53	0,07	0,25
122	554	0,98	1,11	0,08	0,06
124–126	555	1,17	1,06	0,58	0,48
211–212	569	2,12	1,14	0,67	0,13
274–276	584	1,01	1,41	0,08	0,51
280–281	597	1,04	1,13	0,08	0,08
303–305	659	1,60	1,35	0,17	0,52
318–320	661	1,79	0,80	0,24	0,05
392	678	0,99	1,21	0,05	0,21
408–409	686	1,43	1,29	0,10	0,14
457	690	1,60	1,18	0,11	0,49
Soiul tester (7–9)		2,03		0,76	

Conţinutul de carotinoide totale al hibrizilor este în majoritatea cazurilor inferior aceluia al liniei mamă, în timp ce conţinutul de provitamine A este în general superior aceluia al liniilor consangvinizate corespunzătoare.

Cu toate că proporţia de provitamine A din carotinoidele totale este cuprinsă aproximativ între aceleaşi limite, atît la liniile consangvinizate cît şi la hibrizii lor, comportarea diferitelor linii în urma polenizării

cu soiul Galben timpuriu este diferită. Unele linii transmit la hibrizi o proporție mai ridicată de carotinoide cu rol de provitamine A, altele una mai scăzută, iar altele nu modifică prea mult raportul dintre carotinoidele totale și cele cu rol de provitamine A (tabela 3).

Tabela 3

Procentul de provitamine A din carotinoidele totale, procentul de carotinoide totale și provitamine A al hibrizilor față de liniile consangvinizate corespunzătoare

Linia-mamă	Hibridul	% de provitamine A din carotinoidele totale		Conținutul hibridului (% față de linia-mamă) în :	
		Linia-mamă	Hibridul	Carotinoide totale	Provitamine A
13—14	725	15,0	19,5	230,0	300,0
22—24	727	11,7	11,1	70,5	61,5
25—27	728	3,8	9,0	96,1	225,0
40—41	546	45,1	9,0	88,4	17,6
58—60	724	6,1	16,3	134,2	357,1
122	554	8,1	5,4	113,2	75,0
124—126	555	49,5	45,2	90,6	82,7
211—212	569	31,6	11,4	53,7	19,4
274—276	584	7,9	36,1	139,6	637,5
280—281	597	7,6	7,8	108,6	100,0
303—305	659	10,6	38,5	84,3	305,8
318—320	661	13,4	6,2	44,6	20,8
392	678	5,0	17,3	122,2	420,0
408—409	686	7,0	10,8	90,2	140,0
457	690	6,8	41,5	73,7	445,4
Media		15,2	19,6	102,7	202,3
Soiul tester (7—9)		37,4			

Conținutul de provitamine A este un caracter mai variabil decît conținutul de carotinoide totale, atît la liniile consangvinizate cît și mai ales, la hibrizi. În plus, conținutul de provitamine A realizează creșteri net superioare (în medie 202,3 %) creșterii medii a conținutului de carotinoide totale (102,7 %), ceea ce devedește o tendență de îmbunătățire a raportului în favoarea provitaminelor A.

Sporurile relative ale conținutului de carotinoide totale și de provitamine A sînt mai mari la hibrizii ale căror linii materne sînt mai sărace, și mai mici la hibrizii ale căror linii materne sînt mai bogate în carotinoide totale, respectiv în provitamine A.

Caracterul mai variabil al carotinoidelor cu rol de provitamine A și tendința de creștere a proporției lor la unele combinații hibride dovedește posibilitatea practică de obținere a unor hibrizi de porumb cu valoare biologică ridicată.

Prezentată la redacție la 23 noiembrie 1970

Catedra de chimie
Institutul agronomic „Dr. P. Groza"
Cluj

BIBLIOGRAFIE

1. C. Bodea, E. Nicoară, Probleme agricole, **8**, 80 (1954).
2. C. Bodea, E. Nicoară, Studii şi cercetări de agronomie, **VIII**, 195 (1957).
3. C. Bodea, Gh. Illyes, C. Bilaus, I. Căbulea, Rev. roum. Biochim., **5**, 11 (1968).
4. F. Zetea, C. Bodea, St. cerc. biochim., **12**, 387 (1969).
5. F. Zetea, C. Bodea, St. cerc. biochim., **12**, 189 (1969).
6. C. Bodea, M. Florescu, V. Drugan, St. cerc. biochim., **1**, 109 (1958).

CAROTENOID CONTENT IN THE SEEDS OF SOME CORN HYBRIDS AS COMPARED TO THEIR GENITORS

SUMMARY

The determination of the total content of carotenoids and provitamin A in 15 inbreds and in their hybrids with the sort „Galben timpuriu" proves that the provitamin A content is more variable than that of the other carotenoids, its ratio showing a distinct increase tendency by cross-breeding.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 2, 215–228 (1971)

REFERAT GENERAL

ROLUL PIGMENȚILOR CAROTINOIDICI ÎN ORGANISMELE VEGETALE

GAVRIL NEAMȚU

A. RĂSPÎNDIREA PIGMENȚILOR CAROTINOIDICI ÎN PLANTE

Carotinoidele sînt pigmenți naturali neazotați, care imprimă țesuturilor în care apar o culoare galbenă, portocalie sau roșie, în funcție de numărul dublelor legături conjugate din moleculă. Spre deosebire de ceilalți pigmenți naturali (clorofile, flavonoide, pigmenți porfirinici etc.), carotinoidele au o largă răspîndire în natură, atît în regnul vegetal cît și în cel animal [1], [2].

În regnul vegetal, carotinoidele se găsesc în plante superioare și inferioare, atît în organisme clorofiliene cît și neclorofiliene. În plantele superioare, carotinoidele se află în frunze, flori, fructe, rădăcini, tulpini, semințe și polen [3], [4], [5], [6].

În țesuturile verzi, carotinoidele se găsesc în cloroplaste, împreună cu clorofilele, majoritatea sub formă de „complecși cromoproteici" [7], [8]. În ciuperci, carotinoidele se găsesc dizolvate în grăsimi, iar în petalele florilor, în rădăcinile morcovilor, în fructele tomatelor, se găsesc în cromoplaste, în cea mai mare parte în stare cristalină [9].

La nivelul lamelelor cloroplastelor și cromoplastelor, pigmenții carotinoidici se găsesc asociați cu proteine, ARN, ADN, chinone, fosfoproteide etc. [10], [11]. Unele cercetări arată că în cloroplaste este posibil ca aceeași proteină să formeze un complex cromoproteic atît cu clorofilele cît și cu carotinoidele.

Pigmenții carotinoidici nu pot fi extrași din complexele cromoproteice cu solvenți superiori nepolari, ca eterul de petrol, decît după denaturarea acestor complexe cu alcool, acetonă, cloroform etc., ceea ce confirmă existența complexelor lor cu proteinele [7], [12].

Maximele spectrelor de absorbție ale complexelor cromoproteice sînt mai mari decît maximele spectrelor de absorbție ale carotinoidelor extrase din aceste complexe [13]. Acest aspect se crede că se datorează efectului de conjugare a pigmenților carotinoidici cu proteina. Un complex

„β-carotină — proteină" a fost izolat de Nishimura [8] din frunzele de spanac. El conține o cantitate mică de β-carotină, iar semnificația sa biologică încă nu este suficient cunoscută.

Cercetările din ultimul timp arată că sistemul de duble legături conjugate din molecula carotinoidelor ușurează formarea complexelor de ioni de carboniu, în prezența unui donor de protoni sau a unui acceptor de electroni, cu o deplasare a maximului de absorbție spre lungimi de undă mai mari [2], [7], [12]. Platt [14] consideră complexele cromoproteice drept complexe de transfer de sarcină, a căror semnificație funcțională în transferul de energie sau în transferul de oxigen, în cadrul celulei, nu se cunoaște.

B. IPOTEZE ȘI TEORII PRIVIND ROLUL PIGMENȚILOR CAROTINOIDICI ÎN ORGANISMELE VEGETALE

Sub aspect chimic, pigmenții carotinoidici sînt relativ bine cunoscuți, însă rolul lor în diferitele procese metabolice ale plantelor nu se cunoaște încă destul de temeinic. Numeroasele cercetări întreprinse în direcția cunoașterii mecanismului de acțiune al carotinoidelor în organismele vegetale nu au putut duce pînă în prezent, decît la enunțarea unor ipoteze, care, din nefericire, nu se bazează pe o documentare experimentală bogată pe organisme vii. Cele mai multe experiențe s-au efectuat „in vitro", iar „in vivo" mai ales pe alge, ciuperci, bacterii fotosintetizante, și mai puțin pe plante superioare.

Ipotezele și teoriile despre funcțiile și rolul carotinoidelor în organismele vegetale se bazează, în general, pe două proprietăți esențiale ale acestor pigmenți :

a) capacitatea lor de a fixa oxigenul,
b) capacitatea lor de a absorbi energia luminoasă.

I. ROLUL CAROTINOIDELOR ÎN PROCESELE DE OXIDO-REDUCERE

Ipotezele și teoriile care atribuie carotinoidelor un rol însemnat în procesele de oxido-reducere din organismele vegetale sînt multiple și variate [4], [5].

A. Arnaud susținea încă în 1889 că stabilitatea carotinoidelor în frunze se datorește participării lor la reacțiile de oxido-reducere, iar nestabilitatea lor în soluție o explică tocmai prin lipsa unor sisteme redox [15]. Această părere a fost acceptată și dezvoltată de R. Willstäter și A. Stoll [16], după care clorofilele și carotinoidele sînt atît de strîns legate unele de altele, încît în plante formează un sistem redox conjugat :

$$\text{clorofila a} \underset{-O_2}{\overset{+O_2}{\rightleftharpoons}} \text{clorofila b}$$

$$\text{carotinoide hidrocarburice} \underset{-O_2}{\overset{+O_2}{\rightleftharpoons}} \text{xantofile}$$

Prin experiențe ulterioare privind stabilitatea acestor pigmenți la temperaturi ridicate și la intensități mari de lumină, A. Seybold, în 1938, infirmă existența unui sistem redox conjugat între clorofile și xantofile [17]. Formarea amidonului în plante este determinată, după A. Seybold, de prezența clorofilei b. Cercetînd unele specii din genul Allium ce nu formează amidon, Seybold a constatat insuficiența clorofilei b, dar n-a găsit deosebiri esențiale în ce privește raportul dintre carotinoidele hidrocarburice și xantofile [17].

1. *Rolul carotinoidelor în procesele de autooxidare*

Prin faptul că pigmenții carotinoidici se pot comporta atît ca „acceptori" cît și ca „donori" de oxigen, ei pot să îndeplinească un rol important în procesele de autooxidare a unor substanțe [4].

Se cunosc unele lucrări care arată participarea carotinoidelor la procesele de autooxidare a acizilor grași nesaturați și a uleiurilor sicative. Cînd aceste substanțe sînt proaspete, neoxidate inițial, carotinoidele adăugate în cantități mici exercită o acțiune antioxigen, care se manifestă printr-o întîrziere a procesului de autooxidare. În cazul cînd acizii și uleiurile sînt parțial oxidate, respectiv parțial rîncezite, carotinoidele au un efect contrar, prin prezența lor ele grăbesc oxidarea. Autorii explică efectul prooxigen prin formarea unor peroxizi ai carotinoidelor, transmițători de oxigen, dar nu găsesc o interpretare potrivită pentru rolul antioxigen al carotinoidelor [1], [6].

Bodea și colaboratorii au arătat că pigmenții carotinoidici pot ocupa în procesele de oxido-reducere poziția unor regulatori ai oxigenului peroxidic [18], [19]. Prin experiențe „in vitro" se demonstrează cum α- și β-carotina pot interveni în procesele de oxido-reducere în două direcții deosebite, datorită comportării lor diferite față de oxigenul hidroperoxidic și de cel molecular. Autorii arată că α - și β-carotina se autooxidează în contact cu oxigenul molecular, formînd grupări hidroperoxidice care funcționează ca donori de oxigen atomic. Oxigenul cedat de grupările hidroperoxidice poate fi acceptat de substanțe nesaturate, sub formă epoxidică. Astfel de acceptori pot fi chiar moleculele încă neautooxidate ale carotinoidelor, ceea ce, în procesul de autooxidare a acestor substanțe, duce la apariția epoxizilor carotinoidici. Este însă posibil ca oxigenul atomic eliberat de grupările hidroperoxidice să acționeze și asupra altor substanțe oxidabile.

Proprietatea carotinoidelor de a funcționa ca acceptori de oxigen peroxidic permite utilizarea lor în practica chimiei organice. Astfel, soluțiile de α- și β-carotină pot servi ca reactivi pentru identificarea radicalilor peroxidici și în studiul reacțiilor de autooxidare în lanțuri [18]. De asemenea, carotinoidele pot fi utilizate ca substanțe antioxigen la conservarea substanțelor autooxidabile. Proprietatea specifică a carotinoidelor hidrocarburice de a acționa pe de o parte ca substanțe care, prin sistemul de duble legături, blochează procesul de autooxidare, și de a forma, pe de altă parte, hidroperoxizi ce promovează polimerizarea, ar putea deschide perspective pentru utilizarea lor ca promotori în tehnica polimerilor înalți [19].

O piedică în calea dezvoltării teoriilor bazate pe capacitatea carotinoidelor de autooxidare este stabilitatea acestora în cloroplaste, spre deosebire de instabilitatea soluțiilor lor. Stabilitatea carotinoidelor „in vivo" se datorește existenței lor sub formă de complexe cromoproteice.

Unii cercetători au arătat că în plante carotinoidele prezintă o mai mare activitate antioxidantă decît prooxidantă. Ei afirmă că plantele cele mai bogate în carotinoide conțin, nu întîmplător, și acid ascorbic în cantitate mai mare și explică această corelație prin aceea că pigmenții carotinoidici apără acidul ascorbic de oxidare [4]. Karrer și Jucker susțin că în procesul de respirație și asimilație pigmenții carotinoidici pot îndeplini fie rolul de acceptori de hidrogen, fie pe cel de transportori de oxigen [1].

2. *Participarea carotinoidelor la transportul oxigenului în procesul de fotosinteză*

Una dintre funcțiile atribuite carotinoidelor este și aceea a transportării oxigenului în procesul de fotosinteză. Această ipoteză se bazează pe ușurința cu care se pot forma și descompune epoxizii carotinoidici, precum și pe existența lor în cantitate mai mare în țesuturile fotosintetizante. Pentru ca o substanță să poată transporta oxigenul în fotosinteză, trebuie să poată fixa oxigenul din apă, rezultat în urma fotolizei, și să-l cedeze ulterior sub influența luminii. Cu toate că epoxizii carotinoidici pot să îndeplinească ambele cerințe, rezultatele cercetărilor în acest domeniu sînt contradictorii [20], [21], [22].

Cholnoky [23] este printre primii cercetători care atribuie carotinoidelor un astfel de rol și propune un mecanism format dintr-un sistem principal:

$$\text{zeaxantină} \xrightarrow{+(O)} \text{anteraxantină} \xrightarrow{-(O)} \text{luteină, asociat cu un sistem secundar format din:}$$

$$\beta\text{-carotină} \xrightarrow{+(O)} \beta\text{-carotin-monoepoxid} \xrightarrow{-(O)} \alpha\text{-carotină}$$

Cînd procesul de fotosinteză este mai intens, predomină sistemul primar, iar cînd el este mai puțin intens, sistemul secundar.

Sapojnikov [24] a arătat că principalele carotinoide oxigenate — luteina și violaxatina — pot îndeplini, prin reacții de oxido-reducere și de interconversiune, rolul de transportori ai oxigenului în fotosinteză. Reacția poate fi redată astfel:

$$\text{violaxantină} \underset{+O_2}{\overset{-O_2}{\rightleftharpoons}} \text{luteină}$$

Este posibil, de asemenea, ca prin reacțiile de oxido-reducere a violaxantinei, anteraxantinei și zeaxantinei, toate carotinoide cu structură β-ononică, oxigenul provenit din fotosinteză să poată fi transportat conform următoarei ecuații:

$$\text{violaxantină} \underset{+(O)}{\overset{-(O)}{\rightleftharpoons}} \text{anteraxantină} \underset{+(O)}{\overset{-(O)}{\rightleftharpoons}} \text{zeaxantină}$$

Deoarece xantofilele se pot forma, prin oxidare, din carotinoide hidrocarburice (și invers), s-a considerat că xantofilele servesc ca substanțe transmițătoare de oxigen în interiorul cloroplastelor [25]. Costes [10], [26], prin experiențe cu izotopi radioactivi, a arătat transformarea xantofilelor și a epoxizilor în carotinoide hidrocarburice, și invers.

Cu toate că unii cercetători nu atribuie carotinoidelor un rol direct în transportul oxigenului, acești pigmenți pot servi foarte bine ca „sisteme tampon" pentru electroni, în procesul de fotosinteză. Carotinoidele pot atît să accepte electronii din mecanismul fotosintezei, cînd aceștia sînt în exces, cît și să-i redea sistemului, cînd aceștia pot fi acceptați. Transformarea epoxizilor în xantofile este o reacție netă de acceptori de electroni, iar reacția inversă este donoare de electroni.

În ultimul timp se aduc noi dovezi în privința participării carotinoidelor la procesele de oxido-reducere ale fotosintezei [27], [28]. Horvatovic [27], infectînd orzul cu Erisiphe graminis f.sp. hordei, a observat că imediat după infectare se produce o creștere a cantității de violaxantină și o descreștere corespunzătoare a celei de luteină, și corelează aceste transformări cu procesul de respirație și fotosinteză al plantei infectate.

Prin iluminarea periodică a frunzelor de spanac, s-a arătat că procesul de fotosinteză determină o schimbare a raportului dintre carotinoide, ca urmare a participării acestora la procesele de oxido-reducere ale fotosintezei [29].

II. ROLUL CAROTINOIDELOR ÎN ABSORBȚIA ENERGIEI LUMINOASE ÎN PROCESUL DE FOTOSINTEZĂ

Pentru ca energia luminoasă să poată participa la procesul de fotosinteză, trebuie să fie absorbită. Absorbția se face de către pigmenții din cloroplaste, dintre care amintim clorofila *a*, clorofila *b*, pigmenții carotinoidici, pigmenții ficobilinici, flavonoidele etc. Dintre acești pigmenți, clorofila *a* se găsește în toate țesuturile fotosintetizante și reprezintă pigmentul principal, indispensabil în fotosinteză, iar pigmenții carotinoidici o ajută în înfăptuirea asimilației clorofiliene. Ei nu pot avea un rol principal și direct în fotosinteză, deoarece țesuturile fără clorofilă, dar bogate în carotinoide — fructe, flori, rădăcini, ciuperci etc. — nu pot produce sinteza substanțelor organice din substanțe anorganice, cu ajutorul energiei luminoase. Rolul secundar, dar important, ce revine carotinoidelor în fotosinteză este de a absorbi energia luminoasă și a o transfera clorofilei *a* [30], [31], [32].

Energia radiantă absorbită de pigmenții carotinoidici poate fi folosită atît pentru sensibilizarea fotosintezei, cît și pentru a produce fluorescența clorofilei *a* [33], [34].

Pigmenții carotinoidici absorb energia luminoasă, sub formă de cuante, la nivelul dublelor legături conjugate din moleculă. Cu cît lanțul polienic al dublelor legături conjugate este mai lung, cu atît carotinoidele pot absorbi radiații cu lungimi de undă mai mari. În general carotinoidele absorb radiații din regiunea vizibilă a spectrului de absorbție al luminii solare, care sînt folosite în fotosinteză.

Numeroase cercetări s-au întreprins și în ce privește mecanismul transferului de energie de la pigmenții carotinoidici la clorofila *a*. Majoritatea cercetătorilor susțin că acest transfer se face prin rezonanță inductivă [2], [30], [32], [35]. Eficacitatea lui depinde de doi factori :

1. Intimitatea asocierii pigmenților, care poate să cuprindă atît apropierea spațială cît și atașamentul chimic ;

2. Suprapunerea parțială a benzii de fluorescență a pigmenților carotinoidici cu banda de absorbție a clorofilei *a*, care este măsura rezonanței dintre cei doi pigmenți.

Primul criteriu este îndeplinit, deoarece atît apropierea spațială cît și atașamentul chimic permit transferul energiei prin rezonanță.

Pentru demonstrarea celui de-al doilea criteriu sînt necesare cît mai multe date experimentale, deoarece fluorescența carotinoidelor colorate n-a fost dovedită, deși probe indirecte sugerează că fluorescența fucoxantinei se extinde în regiunea spectrală de 650 nm [34].

Transferul energiei se face, în general, cu eficacitate diferită, în funcție de natura pigmenților, și poate să se producă numai de la un pigment care absoarbe radiații cu lungime de undă mai scurtă, la un pigment ce absoarbe radiații cu lungime de undă mai mari, nu și invers.

Transferul energiei de la pigmenții carotinoidici la clorofila *a* se face atît la plantele superioare, cît și la diferitele feluri de alge, diatomee și bacterii fotosintetizante. Randamentul cel mai mic pare să fie la frunzele plantelor superioare, în medie de 20 — 25 %. La algele verzi, cantitatea de energie transferată este mai mare, în medie de 30 — 35 %. La alga Chlorella vulgaris, Duysens a obținut un randament de 40 — 50 % [31]. La algele brune și diatomee, care conțin ca pigment principal fucoxantina, eficacitatea transferului de energie se ridică pînă la 85 — 90 % , iar în unele cazuri chiar de 100 %.

Emerson [36], studiind randamentul fotosintezei sub influența radiațiilor de diferite lungimi de undă, a constatat că la Chlorella vulgaris fotosinteza descrește foarte rapid între 680—700 nm, deși are loc absorbția radiațiilor în această regiune. Cercetările ulterioare au arătat că există o formă a clorofilei *a* care absoarbe radiații în regiunea roșului îndepărtat și care nu este activă în procesul de fotosinteză. Emerson și colab. au arătat că absorbția în roșu îndepărtat poate fi făcută eficientă în fotosinteză, dacă este suplimentată de o absorbție simultană de către pigmenții carotinoidici. Creșterea randamentului fotosintezei, datorită simultanei iluminări cu radiații de diferite lungimi de undă, s-a stabilit și la Porphyridium, Porphyra, Anacystis, Navicula etc. Aceste rezultate sînt dovezi sugestive despre participarea a două „lumini" la procesul de fotosinteză, una rezultînd din absorbția clorofilei *a*, iar alta din absorbția pigmenților carotinoidici (accesorii) [2].

În 1959, Brown și French [37] au făcut un studiu asupra spectrelor de absorbție „in vivo", la diferite plante, cu ajutorul unui spectrofotometru diferențiat, și au constatat că „in vivo" există trei forme distincte ale clorofilei *a*, caracterizate prin poziția maximelor de absorbție în regiunea roșie, la 673,683 și 695 nm. Extractul clorofilei *a* din organisme dă un singur maxim în această regiune (caracteristic clorofilei *a*), la 660 nm. Autorii au arătat că formele clorofilei *a* cu absorbție la 683 și 695 nm sînt capabile să producă singure fotosinteza, dar forma care absoarbe la 673 nm numai cu

ajutorul energiei primite de la pigmenții accesorii, deci și de la cei carotinoidici.

Cercetările de fluorescență a clorofilei aduc noi argumente privind participarea carotinoidelor la procesul de fotosinteză, astfel că rolul fotosensibilizator al carotinoidelor este bine stabilit [32], [33], [36], [37], [38], [39], [40], [41].

III. ROLUL CAROTINOIDELOR ÎN PROTEJAREA CLOROFILEI DE AUTOFOTODISTRUGERE

Primele și cele mai numeroase experiențe privind rolul protector al carotinoidelor au fost efectuate pe bacterii fotosintetizante [2], [42], [43].

Griffiths a cultivat un mutant de Rhodopseudomonas spheroides care conține numai carotinoide incolore, în special fitoen, și a constatat că, în mutant, bacterioclorofila este sintetizată în cantitate mai mică decît în celulele normale, care conțineau carotinoide colorate [42]. Prin expunerea mutantului la lumină, în condiții de aerobioză, creșterea celulelor a fost oprită brusc, bacterioclorofila a început să se degradeze și, într-un timp foarte scurt, toate celulele au fost distruse. Expuse la lumină, în condiții de anaerobioză, sau la întuneric, în condiții de aerobioză, celulele mutantului funcționau normal nesuferind degradări. Experiențele ulterioare au dovedit de asemenea că nici lumina și nici oxigenul, separate, nu au acțiune dăunătoare asupra celulelor mutanților. Distrugerea bacterioclorofilei și a celulelor rezultă dintr-o acțiune comună a celor doi factori, „o acțiune fotodinamică". Celulele normale de Rhodopseudomonas spheroides, care conțin carotinoide colorate, nu au fost distruse în condiții de lumină și aerobioză, ceea ce confirmă rolul important ce revine carotinoidelor în protejarea celulelor de fotooxidare. Rezultate asemănătoare s-au obținut și în experiențele cu Corynebacterium poinsettiae, Sarcina lutea, Mycobacterium species.

Dacă culturile de Rhodopseudomonas spheroides, Rhodospirillum rubrum și Chromatium, specii care conțin carotinoide colorate, au fost tratate cu difenilamină a fost blocată sinteza carotinoidelor colorate dar nu și a carotinoidelor incolore. Celulele expuse la lumină și oxigen au fost repede distruse. După îndepărtarea difenilaminei, celulele și-au recăpătat capacitatea de a sintetiza carotinoide colorate, și astfel au rezistat acțiunii fotodinamice a luminii și a oxigenului.

Cercetările efectuate pe alte grupe de plante au dus la rezultate similare, arătînd că rolul de protecție este o funcție principală a carotinoidelor în organismele vegetale [2], [44], [45], [46].

La alga Chlorella vulgaris, Claes [47] a descris patru mutanți cu raze X. Trei dintre acești mutanți, care n-au sintetizat carotinoide colorate, au fost distruși prin expunere la lumină și oxigen. Cel de-al patrulea mutant, care conținea carotinoide colorate, a supraviețuit, în aceleași condiții de iluminare. Același fenomen a fost observat și la mutanții algelor Chlamydomonas reinhardi și Chlorella pyrenoidosa [2].

Anderson și Robertson [43], făcînd experiențe cu un mutant de porumb, arată că în condiții de lumină și aerobioză s-a distrus nu numai clorofila mutantului, dar și catalaza, sugerînd că pigmenții carotinoidici co-

loraţi pot avea un rol principal şi, în protejarea de fotodistrugere a altor substanţe decît clorofilele (citocromi, catalaza, peroxidaza, vitamina B_{12}, flavine, pigmenţi flavonoidici), care sînt capabile să absoarbă energia luminoasă.

Deşi relativ bine stabilit, rolul protector împotriva fotooxidărilor, pe care-l exercită carotinoidele colorate, este dificil de explicat. Este posibil ca prin reacţiile de oxidare a carotinoidelor hidrocarburice şi a xantofilelor să se evite acumularea oxigenului activ, la nivelul cloroplastelor.

Acţiunea protectoare împotriva acţiunii luminii poate fi interpretată prin efectul ecran al carotinoidelor. Aceşti pigmenţi pot absorbi o parte din lumina absorbită de clorofilă. Astfel, Claes şi Nakayama [48] au comparat eficacitatea mai multor tetraterpene aciclice (fitoen, fitofluen, ξ-carotină, neurosporen, licopină) şi ciclice (β-carotină, α-carotină) în protecţia distrugerii clorofilei *a* la lumină, în eter de petrol. Autorii au constatat că efectul protector apare numai pentru carotinoidele cu cel puţin nouă duble legături conjugate în moleculă (β-carotină, γ-licopină etc.). Aceşti pigmenţi absorb într-adevăr lumina în regiunea albastră a spectrului de absorbţie al clorofilei *a*, şi este posibil ca absorbţia carotinoidelor să intre în competiţie cu absorbţia clorofilei *a*.

Krasnovsky şi Drosdova [49] au observat, „in vitro", inhibarea fotoreducerii clorifilei *a* în prezenţa acidului ascorbic şi a unor carotinoide, sub acţiunea luminii roşii. Cu cît carotinoidele conţin mai multe duble legături conjugate, cu atît inhibarea este mai puternică. Acţiunea de protecţie este limitată însă numai la radiaţiile vizibile din spectrul luminii solare (radiaţii, de altfel, pe care pigmenţii carotinoidici le pot absorbi.) Carotinoidele nu pot proteja celulelele de efectul negativ al radiaţiilor ultraviolete, al radiaţiilor X sau γ (28).

În 1955, Calvin a propus un mecanism, în reacţiile de fotooxidare a unui substrat, cînd fotooxidarea este sensibilizată de clorofilă. La lumină se va petrece o tranziţie a primei stări, „singlet" excitată, a moleculei de clorofilă, într-o stare „triplet" de viaţă mai lungă (10^{-3} secunde). Molecula acestei stări se va combina cu o moleculă de oxigen, pentru a forma un peroxid foarte reactiv, care poate apoi transmite cu uşurinţă oxigenul unui reducător apropiat, revenind la sensibilitatea fundamentală. Calvin consideră carotinoidele ca acceptori preferenţiali ai oxigenului peroxidic. Participarea carotinoidelor la aceste procese se poate face prin reacţii de oxido-reducere care, „in vivo", se pot pune în evidenţă prin variaţii rapide ale spectrelor de absorbţie ale acestor pigmenţi [5].

Krinsky [28] atribuie „carotinoidelor perechi", cum sînt de exemplu zeaxantina-anteraxantina, un rol important în evitarea fotooxidării clorofilelor sau altor pigmenţi. El consideră că reacţiile de oxido-reducere a acestor „carotinoide perechi" îndeplinesc rolul de „tampon chimic", pentru protecţia celulelor împotriva distrugerilor fotooxidative. Oxidarea zeaxantinei în anteraxantină are loc numai în prezenţa luminii şi oxigenului, condiţii ce se produc în procesul de fotosinteză. Reducerea anteraxantinei în zeaxantină este o reacţie enzimatică şi se petrece la întuneric. Aceste două reacţii constituie un ciclu numit „ciclu epoxidic."

La o iluminare intensă şi de lungă durată, în condiţii de aerobioză, oxigenul se combină cu moleculele de clorofilă şi poate să producă foto-

oxidarea totală sau parțială a acestora. În prezența „carotinoidelor perechi", în cazul nostru anteraxantina-zeaxantina, fotooxidarea clorofilei nu se va produce, deoarece zeaxantina se va combina cu oxigenul fixat de clorofilă și va sintetiza anteraxantina. Printr-un mecanism enzimatic, anteraxantina se va reduce la zeaxantină, care poate intra din nou în circuit [28].

Prin ușurința cu care se pot oxida și reduce unele carotinoide, și alte cupluri de carotinoide, ca de exemplu luteina-eloxantina, violaxantina--anteraxantina, β-carotina-zeaxantina, α-carotina-luteina, ar putea să contribuie într-un mod asemănător la protecția de distrugeri fotooxidative a clorofilelor și a altor substanțe.

Cercetări mai recente, efectuate pe plante superioare, arată că între cantitatea clorofilelor și a carotinoidelor este un raport direct proporțional. Plantele mai sărace în clorofile conțin și carotinoide în cantitate redusă. Dacă clorofilele ar fi sintetizate în cantitate mai mare, iar carotinoidele în cantitate mai mică, o parte din clorofile nu ar putea fi protejate de fotooxidări și s-ar distruge [50].

IV. ROLUL CAROTINOIDELOR ÎN FOTOTROPISM

Participarea carotinoidelor la reacțiile fototropice constituie una din cele mai controversate funcții ale acestor pigmenți în organismele vegetale. Deși s-au întreprins numeroase cercetări în această direcție, rezultatele sînt încă incerte [2], [4], [51].

Principalele argumente în favoarea rolului carotinoidelor în fototropism provin din compararea spectrului de acțiune al fotoreacției cu spectrul de absorbție al carotinoidelor extrase din organul fototrop. S-a stabilit că maximele spectrului de acțiune al plantulelor de ovăz sînt la 370, 425, 474 nm, iar maximele spectrului de absorbție al extractului de carotinoide din coleoptile de ovăz sînt, în hexan, la 422, 442, 474 nm. Diferențele se pot explica prin deosebirea dintre spectrul de absorbție al carotinoidelor „in vivo" și în extract. Principala deosebire privește intensitatea maximului de la 370 nm, care în spectrul de absorbție al carotinoidelor este foarte slab și reprezentat printr-un palier. Acest maxim se datorește, probabil, existenței unui cis-izomer al β-carotinei.

Un alt argument în favoarea participării carotinoidelor la fototropism este cantitatea mai mare de carotinoide din organele fototrope. Pata oculară, stigma flagelatelor și volvocalelor, conțin de asemenea carotinoide în cantitate mai mare. La animale, în purpurul retinian se găsesc de asemenea pigmenți carotinoidici.

În ce privește mecanismul de acțiune al carotinoidelor în fototropism, s-ar putea ca la perceperea luminii carotinoidele să aibă un rol sensibilizator, adică să nu sufere reacții fotochimice, ci, prin energia absorbită, să provoace reacții altor substanțe, deci să îndeplinească un rol fotodinamic.

Unele cercetări arată că pigmenții carotinoidici nu sînt singurele substanțe capabile să producă fototropisme. Astfel, rizomii mușchilor hepatici reacționează fototrop la radiațiile cu lungimea de undă de 497 nm.

Întrucît protoplasma lor este lipsită de clorofilă şi carotinoide, radiaţiile luminoase sînt probabil absorbite de alţi pigmenţi.

Reiner [52] consideră că atît carotinoidele cît şi riboflavina sînt necesare pentru reacţia fototropică la plantulele de ovăz. Carotinoidele sînt concentrate în vîrful plantulei, în timp de riboflavina este distribuită uniform. Reacţia fototropică a vîrfului tulpinei este mult mai mare decît a bazei. Prin experienţe „in vitro", a găsit că atît riboflavina cît şi carotinoidele stimulează la lumină distrugerea heteroauxinei, precum şi că spectrul de absorbţie al carotinoidelor se suprapune parţial cu al riboflavinei (maximul de la 450 nm).

Un număr însemnat de experienţe fototropice s-au efectuat pe ciuperci, îndeosebi pe specii din genurile Mucor, Phycomyces, Pilolobus. Goodwin [2] a arătat că β-carotina favorizează aplecarea fototropică a sporangiei la Phycomyces blakesleeanus. Hocking, în 1963, a arătat, de asemenea, că unele mucoracee, ca Rhizopus nigricans, Pilolobus sphaerospora etc., lipsite de β-carotină, sînt indiferente sau răspund foarte slab la lumină [53].

În prezent numeroşi cercetători împărtăşesc părerea lui Reiner că pigmenţii carotinoidici participă la procesele de fototropism, chiar dacă nu sînt singurii pigmenţi fotoreceptori [52].

V. ROLUL CAROTINOIDELOR ÎN FOTOTAXII

Cele mai numeroase cercetări privind mişcările fototactice s-au efectuat pe flagelate, alge verzi, bacterii purpurii, mixomicete şi zoospori. Dintre algele verzi prezintă mişcări fototactice mai accentuate, la schimbarea direcţiei de propagare a luminii şi a intensităţii, genurile Chlamydomonas, Platymonas, Eudorina, Volvox, iar dintre flagelate genurile Chilomonas, Prorecentum, Piridinium, Euglena etc. Cum unele flagelate lipsite de stigmă nu prezintă reacţii fototactice, în trecut s-a crezut că organul care produce fotoreacţia este stigma de la baza flagelului. Noile cercetări arată că stigma nu este neapărat necesară în mişcările fototactice, deoarece unele specii fără stigmă sînt fototactice, iar altele, cu stigmă, nu prezintă fototactism [4], [22].

Participarea carotinoidelor la procesele fototactice a fost dedusă tot din compararea spectrului de acţiune al organismelor respective, cu spectrul de absorbţie al carotinoidelor. S-a constatat că spectrul de acţiune al organismelor fototactice este mai mare şi mai variat decît spectrul de acţiune al organelor fototrope. Astfel, la Euglena sp., maximele mai intense sînt la 495, 475 nm, şi mai atenuate la 450, 425 nm. Eudorina şi Volvox prezintă un maxim la 492 nm şi un palier la 435 nm. Peridinium prezintă un maxim între 470—480 nm. Diversitatea spectrelor de acţiune se pare că s-ar datora diversităţii pigmenţilor fotosensibili din organismele fototactice.

Haxo [54] consideră că fototaxia gameţilor din Ulva lactuca este mediată de γ-carotină, care se găseşte în cantitate mai mare atît în gameţii masculi cît şi în cei femeli. Pe lîngă β-carotină, în algele libere capabile de fototactism mai participă la procesele de fotoreacţie şi alte carotinoide mai rar întîlnite. La unele specii de Piridinium, principalele carotinoide

cu rol în fototactism sînt dinoxantina și diadinoxantina [2]. Krinsky și Goldsmith [55] susțin că în stigma multor flagelate se găsesc cromoproteide care, pe lîngă β-carotină și astaxantină, conțin euglenonă sau alte ceto-carotinoide.

Speciile cu stigmă Eudorina elegans și Volvox minor au o sensibilitate maximă față de radiațiile cu lungime de undă de 490 nm, în timp ce o specie de Chilomonas, lipsită de stigmă, are sensibilitatea maximă față de radiațiile ultraviolete de 366 nm. Sensibilitatea față de radiațiile ultraviolete se atribuie unor substanțe proteice care intră în alcătuirea protoplasmei. Specia Chlamidomonas eugametos produce, numai la lumină, flageli cu ajutorul cărora se deplasează, pe cînd la întuneric este imobilă. Mobilitatea stă în legătură cu formarea unei carotinoide cu grupări acide — crocetina — care se găsește și în staminele de Crocus. Crocetina acționează în cantitate extrem de mică, cîte o moleculă de fiecare celulă [56].

Bacteriile purpurii au sensibilitatea maximă față de radiațiile roșii și infraroșii. La aceste bacterii, sensibilitatea decurge paralel cu absorbția razelor luminoase de către bacterioclorofilă. Participarea flavinelor la fototactism este neconcludentă.

Cu toate că nu se cunoaște precis organul care produce fototaxia, se poate atribui în general un rol important complexelor cromoproteice, care se pot localiza în stigmă sau în altă parte din corp. Cantitatea de pigment care participă la reacțiile fototactice este cu mult mai mică decît cea implicată în celelalte reacții luminoase. Bacteriile fototactice sînt mai sensibile la lumină decît algele și flagelatele.

Întrucît numeroase plante libere autotrofe și heterotrofe ce conțin pigmenți carotinoidici reacționează față de direcția și intensitatea luminii, se atribuie pigmenților carotinoidici rolul de sensibilizatori în aceste mișcări, asemănător rolului ce-l îndeplinesc în mișcările fototrope.

VI. ROLUL CAROTINOIDELOR ÎN PROCESELE DE REPRODUCERE

Rolul posibil al carotinoidelor în procesul de reproducere, la plantele superioare, a fost studiat de Goodwin, care a tras concluzia că nu se poate stabili o corelație certă între pigmenții carotinoidici și acest proces [2],[4].

Cele mai multe cercetări la plantele superioare s-au ocupat de formarea granulelor de polen, de creșterea tuburilor polenice, precum și de inhibiția polenizării. Unii cercetători au arătat că, din punct de vedere histologic, carotinoidele și lipidele sînt concentrate în tapetul sacului de polen și migrează în granulele de polen care se dezvoltă. Microsporogeneza ar fi deci strîns legată de metabolismul carotinoidelor. Se cunosc însă unii mutanți de floarea soarelui ai căror grăunciori de polen nu conțin carotinoide, dar formează totuși semințe viabile. Lebedev [57], prin experiențe „in vitro", a arătat că creșterea tubului de polen, pe agar, este stimulată la adăugarea β-carotinei. Schwartzenbach [58] a cercetat efectul mai multor carotinoide asupra polenizării la Cyclamen persicum. Cîteva carotinoide stimulează, pe cînd altele, inclusiv β-carotina, întîrzie polenizarea, iar unele nu au nici un efect asupra polenizării.

Dacă pigmenții carotinoidici nu par să aibă un rol esențial în procesele de reproducere la plantele superioare, ei pot, indirect, să contribuie

la acest proces. Prin faptul că pigmenții carotinoidici participă la formarea culorii florilor și fructelor, ei contribuie în mod substanțial la polenizarea florilor și la răspîndirea fructelor și semințelor prin intermediul insectelor și animalelor.

Cele mai numeroase experiențe privind participarea carotinoidelor la procesele de reproducere s-au făcut pe ciuperci, îndeosebi pe specii din genurile Mucor, Phycomyces, Allomyces, Blastocladiella etc. [2].

În 1927, Chodat și Schopfer au descris pentru prima dată o acumulare diferențiată a carotinoidelor în celulele sexuale de Mucor hiemalis și au considerat că pigmenții carotinoidici contribuie la o diferențiere sexuală a gameților [59]. Asemenea constatări au fost făcute și la alte ciuperci, fapt pentru care unii micologi au susținut că pigmenții carotinoidici ar fi indispensabili în procesul de reproducere sexuată. Existența înmulțirii sexuate la ciuperci lipsite de carotinoide și la mutanți infirmă însă această idee.

Deoarece Fusarium oxysporum, cînd este cultivat la întuneric, nu produce nici spori și nici carotinoide, pe cînd la lumina zilei produce atît spori cît și pigmenți carotinoidici, s-a crezut că aceste fenomene ar fi înrudite cauzal. Carlile în 1957 a separat însă cele două fenomene [60]. La culturile tinere, expuse timp de o oră la o lampă cu filament de tungsten, de 80 wați, la 30 cm și 20—25°C, este stimulată producția masivă a macrosporilor, dar nu și a carotinoidelor. Dacă însă culturile tinere sînt expuse timp de 10 ore la o lampă cu vapori de mercur, în aceleași condiții (30 cm și 20—25°C), ele se pigmentează intens, dar nu formează spori. Rezultate asemănătoare s-au obținut și cu Pironema confluens, de către Carlile și Friend, iar autorii arată că fotoactivarea sintezei de carotinoide și inducția formării de macrospori sînt fenomene neînrudite, care cer lungimi de undă diferite [61].

În concluzie, pentru cunoașterea temeinică a rolului pe care pigmenții carotinoidici îl îndeplinesc în organismele vegetale mai este necesar un considerabil efort de cercetare, pentru a stabili, în mod precis, mecanismele prin care acești pigmenți participă la diversele procese metabolice din celule și țesuturi.

Pigmenții carotinoidici — arată Goodwin [2] — continuă încă și poate vor mai continua să uluiască pe cercetători, prin diversitatea lor structurală, și să producă confuzii, prin lipsa lor aparentă de funcții biochimice și fiziologice. Este însă greu de crezut că selecția naturală ar fi atît de ineficace, încît cei mai răspîndiți pigmenți naturali să apară pasivi și fără funcții în organismele atît de variate în care se găsesc.

Prezentată la redacție la 16 iulie 1969

Catedra de biochimie
Institutul agronomic „Dr. Petru Groza"
Cluj

BIBLIOGRAFIE

1. P. Karrer, E. Jucker, *Carotenoids*. Elsevier Publishing Company. Inc., 1950, pag. 8
2. T. W. Goodwin., *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. Acad. Press, London and New York, 1965, pag. 127.
3. T. Swain, *Comparative Phytochemistry*. Acad. Press, London and New York, 1966, pag. 121.

4. T. W. Goodwin, *Sravitelnaia Biohimia Karotinoidov*. Izdatelistvo Inostranoi Literaturî, Moscova, 1954, pag. 13.
5. W. Ruhland, *Encyclopedia of Plant Physiology*. Springer Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1960, Vol. V_1, pag. 394.
6. W. Ruhland, *Encyclopedia of Plant Physiology*. Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1958, Vol. X, pag. 186.
7. S. Brown, I. Prebble, Biochem. J., **100**, 548 (1966).
8. M. Nishimura, K. A. Takamatsu, Nature **180**, 699 (1957).
9. T. N. R. Varma, C. O. Chichester, Food Technol., **3**, 109 (1961).
10. C. Costes, *Recherches sur la biosynthèse et le métabolisme des caroténoïdes dans les feuilles*. Teză de doctorat, Paris, 1965.
11. I. P. Thornber, C. A. Smith, I. L. Bailey, Biochem. J., **100**, 1 (1966).
12. W. L. Lee, P. F. Zagalsky, Biochem. J., **101**, 1 9 c (1966).
13. I. S. Kahn, A. E. Purcell, Archiv. Biochem. Biophys., **112**, 355 (1965).
14. I. R. Platt, Science, **129**, 372 (1959).
15. A. Arnaud, Compt. rend., **109**, 911 (1889), Cit. din „*Sravitelnaia Biohimia Karotinoidov*", T. W. Goodwin, Izdatelistvo Inostranoi Literaturî, Moscova, 1954, pag. 101.
16. R. Willstätter, A. Stoll, *Untersuchungen über Chlorophyll*. Berlin, Springer, (1913), Cit. din „*Sravitelnaia Biohimia Karotinoidov*", (T. W. Goodwin), Izdatelistvo Inostranoi Literaturî, Moscova, 1954, pag. 102.
17. A. Seybold, K. Egle, Planta, **29**, 119 (1938), Cit. din „*Sravitelnaia Biohimia Karotinoidov*", (T. W. Goodwin,) Izdatelistvo Inostranoi Literaturî, Moscova, 1954, pag. 102.
18. C. Bodea, E. Nicoară, M. Florescu, J. Gross, St. cerc chim., *1*, **V**, 27 (1957).
19. C. Bodea, M. Florescu, St. cerc. chim., *1—2*, III, 103 (1955).
20. S. M. Forster, Plant Physiol., **41**, 422 (1966).
21. H. Lundegardh, Physiol. Plantarum., **16**, 442 (1963).
22. H. Y. Yamamoto, Archiv. Biochem. Biophys., **96**, 645 (1962).
23. L. Cholnoky, C. Györgyfy, E. Naghy, H. Panzel, Nature **178**, 410 (1956).
24. D. I. Sapojnikov, T. A. Krasnovskaia, A. Maevskaia, Doklady Akad. Nauk. S.S.S.R., **113**, 465 (1957).
25. U. Blass, I. M. Anderson, M. Calvin, Plant Physiol., **34**, 329 (1959).
26. C. Costes., Compt. rend., **256**, 5656 (1963).
27. E. H. Horvatovic, Nature, **209**, 1135 (1966).
28. N. I. Krinsky, Cit. din „*Biochemistry of Chloroplasts*", (T. W. Goodwin,) Academic Press. London and New York, 1966, Vol. I., pag. 423.
29. H. V. Donohue, T.O.M. Nakayama, C. O. Chichester, Cit. din „Biochemistry of Chloroplasts", (T. W. Goodwin), Academic Press. London and New York, 1967, Vol. II, pag. 431.
30. D. I. Aron, Nature, **184**, 10 (1959).
31. L.N.M. Duysens, Ann. Rev. Plant. Physiol., **7**, 25 (1956), Cit. din „*Recherches sur la biosyntèse et le métabolisme des caroténoïdes dans les feuilles*", (C. Costes), Teză de doctorat, Paris, 1965.
32. H. Lundegardh, Physiol. Plantarum., **19**, 754 (1966).
33. M. Murata, Biochim. Biophys. Acta, **126**, 234 (1965).
34. F. W. Y. Tale, Nature, **181**, 415 (1958).
35. W. Arnold, I. R. Oppenheiner, J. gen. Physiol., **33**, 423 (1950) Cit. din „Encyclopedia of Plant Physiology", (W. Ruhland), Vol. V_1, 1960, pag. 394.
36. R. Emerson, E. Rabinowitch, Plant Physiol., **35**, 477 (1960).
37. I. S. Brown, C. S. French, Plant Physiol., **34**, 305 (1959), Cit. din *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. (T. W. Goodwin), Acad. Press. London and New York, 1965 pag. 356.
38. I. H. C. Smith, C. S. French, Annl. Rev. Plant. Physiol., **14**, 181 (1963).
39. D. I. Sapojnikov, *Biokimia i biofizika fotosinteza*. Edit. Nauka, 1965, pag. 190.
40. H. Lundegardh, Nature, **216**, 981 (1967).
41. V. S. Saakov, Doklady Akad. Nauk. S.S.S.R., **181**, 1001 (1968).
42. M. Griffiths, W. R. Sistrom, G. Cohen-Bazire, R. V. Stanier, Nature, **176**, 1211 (1955).
43. I. C. Anderson, D. S., Robertson, Plant Physiol., **35**, 531 (1960).
44. G. Cohen-Bazire, R. Stanier, Nature, **181**, 250 (1958).
45. R. C. Fuller, I. C. Anderson, Nature, **181**, 252 (1958).
46. M. Mathens, W. R. Sistrom, Nature, **184**, 1892 (1959).
47. H. Claes, Z. Naturforsch, **13** b, 222 (1958), Cit. din „*Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*" (T. W. Goodwin), Acad. Press. London and New York, 1965, pag. 398.

48. H. Claes, T. O. M. Nakayama, Z. Naturforsch., **14** b, 746 (1959), Cit. din „*Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*", (T. W. Goodwin), Acad. Press. London and New York 1965 pag. 398.
49. H. H. Krasnovsky, N. N. Drosdova, Biokimia, **26**, 859 (1961).
50. D. S. Robertson, M. D. Bachmann and I. C. Anderson, Photochem. and Photobiol., **5**, 797 (1966).
51. M. H. Zenk, Z. Pflanzenphysiol., **56**, 112 (1967).
52. I. Reinert, Z. Bot., **41**, 103 (1953), Cit. din „*Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*" (T. W. Goodwin), Acad, Press. London an New York 1965, pag. 385.
53. D. Hocking, Nature, **197**, 404 (1963).
54. F. T. Haxo, K. A. Clendenning, Biol. Bull., **105**, 103 (1953)
55. N. I. Krinsky, T. H. Goldsmith, Arch. Biochem. Biophys., **91**, 271 (1960).
56. E. Pop, St. Peterfi, N. Sălăgeanu, H. Chirilei, *Manual de fiziologia plantelor*. Edit. didactică și pedagogică, București, 1964, Vol. II., pag. 664.
57. S. T. Lebedev, G. F. Reshetova, Doklady Akad. Nauk. SSSR, **79**, 299 (1951).
58. F. H. Schwartzenbach, Helv. Chim. Acta, **34**, 1064 (1951).
59. R. Chodat, W. H. Schopfer, C. R. Soc. Phys. hist. mat., Genève **44**, 176 (1927), Cit. din „*Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*" (T. W. Goodwin), Acad. Press. London and New York 1965, pag. 392.
60. M. J. Carlile, Nature, **180**, 202 (1957).
61. M. J. Carlile, J. S. Friend, Nature, **178**, 369 (1956).

Pyridine Nucleotide — Dependent Dehydrogenases (Dehidrogenazele dependente de piridinnucleotide). Sub redacția lui Horst Sund, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1970, 472 p., 238 fig.

În acest volum se prezintă lucrările simpozionului internațional cu același nume, desfășurat în spetembrie 1969 la Konstanz, în R.F. a Germaniei. Participarea unor savanți cunoscuți în lumea întreagă, ca Theorell, Kaplan, Krebs, Koshland, Jaenicke, subliniază nivelul superior al discuțiilor purtate și profunzimea cu care problemele au fost dezbătute. Se abordează interacțiunile substrat — coenzimă — enzimă în transferul de hidrogen, diferitele trepte ale structurii proteinice a dehidrogenazelor, de la structura primară la configurația cuaternară a subunităților protomerice, mecanismele funcționale ale dehidrogenazelor interconectate în ansamblul metabolic al celulei vii. Fenomenele de cooperativitate interprotomerică care au loc în structurile cuaternare ale enzimelor, ca și tranzițiile alosterice ale stărilor conformaționale sînt interpretate în lumina teoriei relaxării, a momentelor de relaxare moleculară și abordate prin metode adecvate acestei interpretări, ca metoda saltului termic, dispersia optică rotatorie, difractometria în unghi mic. Structurile enzimelor sînt redate în gradații variate, de la structura primară a secvențelor de aminoacizi din lanțurile polipeptidice ale D-gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenazei, pînă la harta de densitate eleetronică a ansamblului tetrameric al dehidrogenazei lactice.

Funcțiile enzimelor sînt urmărite prin diferite metode ale cineticii enzimatice, ca cinetica saturării cu substrat, curba vitezei de reacție, curbele de echilibru dinamic, curbele salturilor termice, ultimele aprofundînd comportamentul reacțional al unei enzime în intervale de timp de ordinul milisecundelor.

Pentru elucidarea structurii și mecanismelor funcționale ale diferitelor dehidrogenaze, autorii au folosit un arsenal instrumentar extrem de bogat, potrivit celor mai moderne tehnici de abordare, și cu toate că metodele nu sînt prezentate în detaliu, indicațiile bibliografice, foarte numeroase, fac ca fiecare capitol al acestui volum să fie un îndreptar prețios.

Caracterul deosebit de instructiv al acestui volum nu rezultă numai din prezentarea lucrărilor, ci și din faptul că sînt redate, în cele mai mici amănunte, discuțiile purtate pe marginea fiecărei comunicări, luptele de opinii, schimburile de idei, materiale care adesea sînt mai accesibile, datorită faptului că nu au fost trecute prin filtrul rigid al unor reguli formale de publicare. Cercetătorul care începe lectura acestui volum ajunge pe nesimțite la senzația că participă efectiv la dezbateri.

Oricum, cartea se situează la un nivel superior de prezentare și se adresează cadrelor cu o temeinică pregătire în cercetarea biologiei moleculare.

S. Antohi
Institutul de patologie și
genetică medicală „V. Babeș"
București

Inhibitors tools in cell research (Inhibitorii în studiul celulei). Sub ed. TH. BÜCHER şi H. SIES, Springer-Verlag, New York — Heidelberg — Berlin, 1969, 415 p.

Cartea cuprinde o colecţie de articole prezentate la al 20-lea Colocviu al Societăţii de Chimie Biologică, 14—16 aprilie 1969, Mosbach/Baden, dedicat lui O. Warburg (la a 86-a aniversare).

Scopul colocviului a fost de a prezenta aplicarea inhibitorilor în cercetările de biologie celulară, în care aceştia au dus la o mai bună înţelegere a funcţiilor şi a interacţiunilor dintre unităţile cooperative, iar, pe de altă parte, de a se lămuri modul corect de utilizare a acestor substanţe, al căror mecanism de acţiune constituie „o problemă fascinantă".

Materialul este împărţit în cinci secţiuni : procese ADN-dependente (inhibitori ai ADN, ai ARN-polimerazei) ; inhibitorii sintezei proteice (se remarcă articolul lui D. Vazquez şi colab. despre studiul funcţiilor ribozomilor cu ajutorul inhibitorilor) ; structurile supramoleculare (încorporarea aminoacizilor în proteinele membranei mitocondriale, procesele morfogenetice la alga verde Acetabularia, efectul penicilinei asupra sintezei peretelui celular al bacteriilor) ; inhibitorii lanţului respirator (de remarcat articolul lui P. Garland şi colab. despre inhibitorii care acţionează între NADH şi citocromi, al lui Slater şi Ter Welle despre inhibitorii de tipul oligomicinei) ; ultima parte este consacrată compartimentării citoplasmatice (translocarea adeninnucleotidelor, transportul anionilor prin membrana mitocondrială, de J.B. Chappell, interacţiunea dintre fosfolipide şi valinomicină, alameticină şi gramicidina S, inhibitorii gluconeogenezei de H. Lardy).

Foarte valoros este apendicele de la sfîrşitul cărţii în care se prezintă formulele de structură ale tuturor inhibitorilor amintiţi.

Cartea, editată în condiţii grafice excepţionale, cu 150 figuri în text, este utilă tuturor cercetătorilor din domeniul biologiei celulare.

G. Benga
Catedra de biochimie I.M.F.
Cluj

Physical principles and techniques of protein chemistry (Principii fizice şi tehnici în chimia proteinelor, partea A). Sub redacţia lui Sydney J. Leach, Academic Press, New York, London, 1969, 503 p.

Acest volum face parte din seria lucrărilor de biologie moleculară editate de editura Academic Press şi prezintă tehnici de analiză a proteinelor bazate pe diferite proprietăţi fizice ale acestora, şi cuprinde 9 capitole :

1) *Utilizarea microscopiei electronice* de E.M. Slayter 2) *Metodele cu raze* X de R.D.B Fraser şi T.P. MacRae ; 3) *Absorbţia în ultraviolet* de J.W. Donovan ; 4) *Fluorescenţa proteinelor* de R.F. Chen, H. Edelhoch şi R.F. Steiner ; 5) *Studiul cinetic al reacţiilor chimice prin perturbare* de B. Havsteen ; 6) *Proprietăţile dielectrice ale proteinelor* : I. *Relaxarea dielectrică* de S. Takashima ; 7) *Proprietăţile dielectrice ale proteinelor* : II. *Birefringenţa electrică şi dicroism* de K. Yoshioka şi H. Watanabe ; 8) *Electroforeza* de J.R. Cann şi 9) *Filtrarea prin gel* de D.J. Winzor.

Cartea este mai mult de metodologie decît de teorie, dar partea teoretică este în aşa fel redată încît constituie un îndreptar în alegerea tehnicii cele mai potrivite scopului urmărit şi

mai ales, în examinarea critică a rezultatelor, înainte de interpretarea lor în lumina teoriei respective. Tehnicile sînt expuse clar, ilustrate cu grafice şi fotografii din lucrări ale specialiştilor, astfel încît pot trezi uşor interesul celor care vor să utilizeze noile metode fizice pentru cunoaşterea unor modificări subtile care se produc în reacţia proteinelor cu mediul înconjurător sau cu alte macromolecule şi liganzi.

Lucrarea constituie astfel o sursă de informare preţioasă asupra măsurătorilor fizice ale sistemelor proteice, pentru biochimiştii, fizico-chimiştii şi biologii care vor să cunoască în dinamica lor procesele intime care au loc la nivelul moleculelor de proteine.

Elvira Grou
Institutul de biologie „Tr. Săvulescu"
Bucureşti

H.A. FISCHER, G. WERNER, *Autoradiographie* (Autoradiografia), Walter de Gruyter & Co., Berlin, 1971, 214 p., 93 fig., 14 tabele.

Lucrarea prezintă în zece capitole o privire de ansamblu asupra metodelor folosite şi rezultatelor obţinute în cercetările autoradiografice. Ea oferă, în primul rînd, noţiunile de bază şi metodele folosite în autoradiografie, iar în al doilea rînd expune domeniile în care acestea pot fi folosite cu mai multă sau mai puţină eficienţă.

Primele trei capitole, introductive, prezintă noţiuni generale despre izotopii radioactivi şi metodele de marcare. Capitolele 4—6 prezintă autoradiografia aplicată la studiul obiectelor macroscopice (metale, aliaje, amestecuri de substanţe chimice, produse biologice, probe folosite în criminalogie), al obiectelor microscopice şi submicroscopice. Capitolul 7 este consacrat metodelor autoradiografice cantitative. Ultimele capitole cuprind date istorice, bibliografia (489 indicaţii bibliografice) şi un index de termeni.

Lucrarea oferă numeroase detalii tehnice, bogat ilustrate, folositoare mai ales pentru începători.

Modul de expunere a materialului permite cititorului să-şi formeze o părere critică asupra metodelor descrise, pentru că autorii insistă asupra limitelor de aplicabilitate ale acestora.

Doina Onică
Institutul de Biochimie
Bucureşti

HARTMUT PILZ, *Die Lipide des normaten und patologischen Liquor cerebrospinalis* (Lipidele din lichidul cerebrospinal în stare normală şi patologică), Springer Verlag, Berlin—Heidelberg — New York, 1970, 124 p., 4 figuri, 23 tabele.

Lucrarea, care reprezintă volumul al 4-lea al seriei de monografii din domeniul neurologiei, constituie, probabil, o completă vedere de ansamblu asupra lipidelor din lichidul cerebrospinal, atît în stare normală cît şi în stare patologică. Metodele moderne de separare şi determinare au

permis, în ultimul timp, decelarea lipidelor, chiar în cantităţi minime, în lichidul cerebrospinal. Autorul sistematizează şi discută toate informaţiile privind structura chimică a lipidelor, metodele de determinare a acestora în lichid şi diversele rezultate obţinute pînă acum în acest domeniu, adăugîndu-le şi pe acelea ale cercetărilor proprii privind separarea, identificarea şi evaluarea cantitativă a lipidelor prin cromatografia în strat subţire.

Au fost identificate pînă acum colesterinesterul, lecitina, colesterina liberă, sfingomielina, grăsimi neutre, lisolecitina, colamincefalina şi urme de serincefalină, cerebroside etc. Cantitatea totală de lipide din lichid este variabilă, ceea ce face dificilă identificarea, pe această cale, a stărilor patologice; autorul discută factorii care influenţează aceste valori. Este de remarcat prezentarea transformărilor pe care lipidele din lichidul cerebrospinal le suferă în stările patologice — unele cu caracter specific, iar altele nespecifice — ca şi aceea privind originea lor.

În sfîrşit, interesul lucrării constă şi în lista bibliografică impresionantă, care, probabil, reuneşte toate lucrările principale publicate asupra lipidelor din lichidul cerebrospinal.

Sanda Rădulescu
Institutul de Biochimie
Bucureşti

Handbook of Experimental Pharmakology (Manual de farmacologie experimentală), vol. XXV, *Bradykinin, Kallidin and Kallikrein*. Sub redacţia Ervin G. Erdös, Springer Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, 1970, 768 p.

Bradykinina, kallidina şi kallikreina sînt printre cele mai importante substanţe endogene din corpul organismelor, dar pînă acum nu a fost oferită nici o explicaţie, general acceptată, pentru prezenţa lor aici. Volumul XXV al monumentalului manual de farmacologie experimentală este dedicat acestor trei substanţe şi cuprinde contribuţiile a 40 autori din 9 ţări şi anume articole în care problemele atît de complicate ale kininelor sînt atacate din puncte de vedere variate şi, uneori, strict personale.

După capitolul I introductiv, în care este prezentată istoria descoperirii kininelor, capitolul II este dedicat metodelor utilizate în cercetarea acestora; kininogenazele, kininogenele şi kininazele sînt tratate în capitole separate. Cele mai numeroase articole sînt reunite în capitolul VI, în care se examinează acţiunea fiziologică şi farmacologică şi rolul patologic al kininelor. Informaţiile asupra kininelor urinare şi asupra kininelor din afara clasei *mamifere* sînt prezentate în alte două capitole. Trebuie remarcate articolele care prezintă rolul kininelor în vasodilataţia funcţională a glandelor salivare, în circulaţia intracranială, participarea lor la fenomenele inflamatorii şi anafilactice etc.; sînt foarte interesante în deosebi articolele dedicate participării kininelor în stările patologice.

Foarte utilă este sumarizarea literaturii publicate în diverse limbi şi succinta ei discutare.

Ansamblul de articole pe care le reuneşte volumul are, pentru specialist, nu numai valoarea unui instrument de lucru în analiză, ci şi aceea a unui material de bază în interpretare.

Sanda Rădulescu
Institutul de Biochimie
Bucureşti

C. BRESCH şi R. HAUSMANN, *Klassische und molekulare Genetik* (Genetică clasică şi moleculară). Ed. a II-a cu adăugiri, Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1970, 373 p.

Această lucrare, mult îmbogăţită şi modificată faţă de prima ediţie din 1964, este o introducere în genetică şi, prin aceasta, se adresează în primul rînd studenţilor în biologie şi specialiştilor din domeniile înrudite; ea poate servi însă şi drept completare a cunoştiinţelor pentru toţi cei care doresc să cunoască realizările biologiei în ultimii 10—15 ani.

În cele 12 capitole ale cărţii sînt tratate toate problemele principale ale geneticii, de la elementele de bază ale eredităţii şi pînă la biochimia codului genetic; nu lipsesc nici unele probleme speciale ale omului, ca grupele sangvine, gemenii, rasele etc. Sînt de remarcat informaţiile asupra structurii cromosomilor, asupra sintezei proteinelor şi DNA, asupra codului genetic şi a aberaţiilor cromosomiale la om, asupra enzimelor care influenţează DNA, asupra posibilităţilor de sinteză a genelor şi asupra controlului activităţii genetice.

Figuraţia este bogată şi foarte sugestivă; indicaţiile bibliografice, prezentate la fiecare subcapitol, cuprinde numai lucrările foarte recente.

Deşi este o lucrare cu caracter predominant didactic, prezentarea noţiunilor de bază nu apare inutilă specialistului, pentru că este făcută de pe baze foarte moderne. Face o bună impresie faptul că autorii n-au evitat menţionarea şi discutarea problemelor încă nesoluţionate ale geneticii; pe de altă parte, o asemenea atitudine are, desigur, efecte salutare asupra studenţilor, cărora le sînt arătate astfel căile pentru realizarea unor lucrări originale.

Sanda Rădulescu
Institutul de Biochimie
Bucureşti

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici ca: Viaţa ştiinţifică, în care prin scurte note, sînt aduse la cunoştinţa cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei: congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc., Recenzii — în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea aceloraşi date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc., se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie: str. Docenţilor nr. 20, Bucureşti 63, Sectorul I.

1971 JUN 10

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA
ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

R. PORTOCALĂ şi L. POPA, **Acizii ribonucleici celulari şi virali**, 1966, 25×17,50, 375 p. + 8 pl., legat, anvelopă, 26 lei.

M. G. BALŞ, **Imunofluorescenţă şi aplicaţiile ei în inframicrobiologie**, 1966, 22×17,50, 285 p., + 18 pl., legat, anvelopă, 27 lei.

ION CANTACUZINO, **Opere alese, Œuvres choisies**, 1965, 25×17,50, 687 p., legat, anvelopă, 44 lei.

* * * **Omagiu acad. prof.** RALUCA RIPAN, 1966, 30,50×21,50, 628 p. + 2 pl., legat, anvelopă, 50 lei.

La revue „Studii şi cercetări de biochimie" paraît 4 fois par an. Toute commande à l'étranger sera adresée à Întreprinderea de comerţ exterior — LIBRI, Calea Victoriei 126, Boîte postale 134—135 Bucarest, Roumanie ou à ses reprèsentants à l'étranger. En Roumanie, vous pourres vous abonner par les bureaux de poste ou chez votre facteur.

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 14, NR. 2, P. 119 — 234, BUCUREŞTI, IUNIE, 1971

I. P. „Informaţia" — c. 2214

43816

Lei 20.—

F 1330

studii și cercetări de biochimie

3

TOMUL 14

1971

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 14, nr. 3, p. 235—356, București, septembrie, 1971

COMITETUL DE REDACŢIE

Redactor responsabil:

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUŞANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România;
M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU;
VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacţie:

VICTOR GHEŢIE

Revista apare de 4 ori pe an.

Preţul unui abonament anual este de 80 lei.

În ţară abonamentele se fac la oficiile poştale, agenţiile poştale, factorii poştali şi difuzorii voluntari din întreprinderi şi instituţii.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se fac prin Întreprinderea de comerţ exterior — LIBRI, Căsuţa poştală 134—135 (Calea Victoriei 126), Bucureşti, România, sau prin reprezentanţii săi din străinătate.

Manuscrisele, cărţile şi revistele pentru schimb, precum şi orice corespondenţă se vor trimite pe adresa comitetului de redacţie al revistei „Studii şi cercetări de biochimie".

ADRESA REDACŢIEI:
Bucureşti, str. Docenţilor, nr. 20
Sectorul I

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
BIOCHIMIE

Tomul 14, nr. 3 1971

SUMAR

Pag.

E. MACOVSCHI, Demonstrarea existenţei biostructurii 239

E. MACOVSCHI, I. CORNOIU, Eliberarea apei, a substanţelor hidrosolubile şi a ionilor de potasiu şi calciu din biostructura fructelor de măr şi a frunzelor de varză în cursul păstrării 255

V. ALEXANDRESCU, I. SUTKA, I. HAGIMA-CĂLIN, D. POPOV, F. MIHĂILESCU, Formele moleculare ale unor enzime din seminţele unei linii de porumb şi din mutanţii obţinuţi prin iradierea cu neutroni . . . 263

V. ELEFTERESCU, Eliberarea apei, a substanţelor hidrosolubile, a ionilor de potasiu şi calciu şi a ribonucleazei din biostructura frunzelor de porumb sub acţiunea cloramfenicolului şi arsenitului de sodiu 269

I. HURGHIŞIU, A. BREZEANU, Modificarea conţinutului în auxine al plantelor de *Zerna inermis* (Leys) Lindm. provenite din seminţe iradiate cu raze gamma ale ^{60}Co 275

O. MACARIE, D. TĂNĂSESCU, N. MOLDOVEANU, Electroforeza în gel de poliacrilamidă a proteinelor serice provenite de la şobolani masculi cu sindrom litiazic renal indus prin etilenglicol 285

O. MACOVSCHI, Ionii de potasiu şi sodiu în ţesutul muscular striat de iepure 289

N. MIHALACHE, Contribuţii la studiul vitezei de metabolizare a glucidelor 295

S. NICULESCU, D. IORDĂCHESCU, Parametrii optimi de acţiune ai pirofosfat-fosfohidrolazei din seminţele de latir (*Lathyrus sativus* L.) 303

D. POPOV, Acţiunea unor efectori asupra activităţii fosfatazei acide din grîu 311

L. SCOLNIC, Influenţa ionului de rubidiu asupra conţinutului în acid piruvic, în apă totală precum şi asupra exosmozei acidului piruvic din muşchiul sartorius de broască 319

M. ŞERBAN, M. STAN, Efectul administrării de estrogen asupra lactat dehidrogenazei hepatice şi serice, precum şi asupra izoenzimelor sale în intoxicaţia cronică experimentală cu tetraclorură de carbon 327

D. TĂNĂSESCU, C. MEDEŞAN, Activitatea lactat dehidrogenazei din muşchii de broască perfuzaţi cu 2,4-dinitrofenol şi stimulaţi electric 333

S. VASU, S. RĂDULESCU, Acizii nucleici din celulele hifale şi sporii de *Aspergillus niger* 339

RECENZII 353

St. cerc. biochim., tomul 14, nr. 3, p. 235–356, Bucureşti, septembrie, 1971

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
B I O C H I M I E

Tome 14, nr. 3 1971

MUSZAKI KÖNYVTÁR 1882

CONTENTS

Page

E. MACOVSCHI, The demonstration of biostructure existence 239

E. MACOVSCHI, I. CORNOIU, The release of water, hydrosoluble substances and potassium and calcium ions from the biostructure of apple fruit and cabbage leaves during their storage 255

V. ALEXANDRESCU, I. SUTKA, I. HAGIMA-CĂLIN, D. POPOV, F. MIHĂILESCU, The molecular forms of some enzymes from the seeds of one maize inbred and the mutants obtained by neutrons irradiation 263

V. ELEFTERESCU, The release of water, watersoluble compounds, potassium and calcium ions and of ribonuclease from the biostructure of maize leaves, by the action of cloramphenicol and sodium arsenite 269

I. HURGHIŞIU, A. BREZEANU, Modification in auxine content of *Zerna inermis* (Leys) Lindm. plants originating in ^{60}Co gamma ray irradiated seeds 275

O. MACARIE, D. TĂNĂSESCU, N. MOLDOVEANU, Polyacrilamide gel electrophoresis of serum proteins originating in male rats with ethylenglycol-induced renal lithiasis syndrome 285

O. MACOVSCHI, Potassium and sodium ions in the rabbit striated muscle tissue 289

N. MIHALACHE, Contributions to the study of the rate of carbohydrate metabolism 295

S. NICULESCU, D. IORDĂCHESCU, Optimal parameters of pyrophosphate-phosphohydrolase action in seeds of *Lathyrus sativus* L. 303

D. POPOV, The influence of some effectors on the activity wheat acid phosphatase 311

L. SCOLNIC, The effect of rubidium ions upon pyruvic acid and total water content as well as upon pyruvic acid exosmosis from frog sartorius muscles 319

M. ŞERBAN, M. STAN, The effect of estrogen administration upon liver and serum lactate dehydrogenase as well as upon its isoenzymes during experimental chronic intoxication with carbon tetrachloride 327

D. TĂNĂSESCU, C. MEDEŞAN, Lactate dehydrogenase activity in frog muscles perfused with 2.4-dinitrophenol and electrically stimulated 333

S. VASU, S. RĂDULESCU, Nucleic acids in *Aspergillus niger* hyphal cells and spores 339

BOOK REVIEW 353

St. cerc. biochim., tomul 14, nr. 3, p. 235–356, Bucureşti, septembrie, 1971

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 3, 239–253 (1971)

DEMONSTRAREA EXISTENȚEI BIOSTRUCTURII

E. MACOVSCHI

Rezumat. — O teorie nouă este justă dacă permite prevederea și explicarea unor fenomene încă necunoscute, care nu pot fi prevăzute și nici explicate de pe pozițiile altor teorii. De aceea pentru verificarea valabilității teoriei biostructurii s-a luat în considerare faptul că această teorie permite prevederea unui fenomen nou : creșterea proporției de apă liberă și de substanțe hidrosolubile în țesuturile vii sub influența inhibitorilor metabolici. Teoria membranei, teoria sorbției și ipoteza asociației inducției, toate bazate pe concepția moleculară despre natura și alcătuirea materiei vii, nu permit prevederea unui astfel de fenomen și l-ar putea explica dacă, din întîmplare, el n-ar fi fost descoperit. Pentru a constata dacă fenomenul menționat se produce, au fost efectuate cinci serii de cercetări, trei pe frunzele vii și două pe nervii vii, aplicîndu-se în cadrul fiecărei serii cîte o metodă de investigație cu totul diferită de la o serie la alta, și anume măsurarea și analiza sucului vacuolar stors din frunzele vii netratate și tratate cu inhibitori metabolici, dozarea proporției de apă liberă și măsurarea vitezei de evacuare a apei din frunzele menționate, determinări de rezonanță magnetică nucleară de înaltă rezoluție și ecoul de spin la nervii vii tratați și netratați cu inhibitori metabolici. Rezultatele obținute au permis descoperirea fenomenului prevăzut de teoria biostructurii, confirmînd întru totul prevederile acestei teorii. Astfel s-a demonstrat justețea teoriei și existența materiei biostructurate în țesuturile vii.

După elaborarea teoriei biostructurii (Macovschi [5], [8]), s-a pus problema verificării acestei teorii prin demonstrarea existenței materiei biostructurate în materialul biologic viu. În acest scop trebuia imaginat un procedeu experimental adecvat, susceptibil să aducă dovada respectivă, iar pentru elaborarea lui era indicat să recurgem la următorul principiu folosit curent în tehnica verificării valabilității ipotezelor și teoriilor noi.

O teorie nouă, dacă este justă, permite prevederea și explicarea unor fenomene încă necunoscute, care nu pot fi prevăzute și nici explicate de pe pozițiile altor teorii. Dacă cercetările experimentale efectuate anume pentru căutarea acestor fenomene duc la descoperirea lor, înseamnă că noua teorie care a permis prevederea, explicarea și descoperirea acestor fenomene este justă și trebuie admisă în știință.

Unul dintre fenomenele previzibile de pe pozițiile teoriei biostructurii care satisface condițiile de mai sus poate fi conturat pe baza următoarelor deducții. Conform teoriei biostructurii, existența și integritatea

materiei biostructurate sînt posibile numai datorită unui anumit aport de energie biochimică (Macovschi [5] — [7]). Se ştie însă că intensitatea cu care se produce energia în organisme depinde de intensitatea biochimismului care se desfăşoară în ţesuturile vii. Prin urmare, dacă biostructura există, orice micşorare a intensităţii biochimismului tisular şi deci a producerii de energie trebuie să ducă la labilizarea biostructurii, la destrămarea ei parţială, la eliberarea din ea a apei şi a altor substanţe aflate în alcătuirea ei, acestea adăugîndu-se astfel la apa liberă existentă în ţesut şi la substanţele dizolvate în ea. Prin urmare, micşorarea intensităţii biochimismului tisular ar trebui să fie urmată de sporirea atît a cantităţii de apă liberă din ţesut, cît şi a cantităţii substanţelor hidrosolubile dizolvate în această apă (Macovschi [7]).

O micşorare a intensităţii biochimismului tisular poate fi provocată cu ajutorul unor substanţe ca 2,4-dinitrofenolul, azida de sodiu, arsenitul de sodiu şi altele din categoria aşa-numiţilor „inhibitori metabolici". Se ştie că, odată pătrunse în ţesuturile vii, în doze neletale, aceste substanţe, chiar şi în concentraţii slabe (de ordinul 10^{-3} M), micşorează intensitatea biochimismului şi scad producerea de energie biochimică. Prin urmare, dacă biostructura există, ar trebui ca introducerea inhibitorilor metabolici în doze neletale în ţesuturile vii să ducă la destrămarea parţială a biostructurii şi, prin aceasta, la sporirea cantităţii de apă liberă aflată în ţesutul respectiv şi de substanţe hidrosolubile dizolvate în ea.

Astfel *teoria biostructurii permite prevederea unui fenomen nou: creşterea proporţiei de apă liberă şi de substanţe hidrosolubile în ţesuturile vii sub influenţa inhibitorilor metabolici.*

Fenomenul acesta nu a fost cunoscut pînă acum, deşi acţiunea inhibitorilor metabolici asupra ţesuturilor vii se cercetează de mult. Aceasta se datoreşte, probabil, faptului că nici una din teoriile şi ipotezele bazate pe concepţia moleculară despre natura şi alcătuirea materiei vii, cum sînt teoria membranei, teoria sorbţiei sau ipoteza asociaţiei inducţiei, nu permite prevederea unui astfel de fenomen şi nici nu l-ar putea explica dacă, din întîmplare, el ar fi fost descoperit.

Într-adevăr, *teoria membranei* susţine că protoplasma este o soluţie apoasă şi că toată apa protoplasmei vii, fiind liberă, nu se deosebeşte ca stare şi însuşiri de apa obişnuită (Ruch şi Fulton [18], Nasonov [16], Macovschi [5], [7]). Prin urmare, inhibitorii metabolici nu ar mai avea de unde şi din ce să mai elibereze o nouă cantitate de apă. De aceea, conform acestei teorii, ţesuturile vii tratate cu inhibitori metabolici nu pot conţine decît aceeaşi cantitate de apă liberă ca şi ţesuturile martor netratate cu inhibitori. Eventualitatea eliberării apei „legate" din coloizii hidrofili nici nu poate fi luată în considerare, deoarece legarea apei de coloizi se face cu eliberare nu cu consum de energie. Încă şi mai puţin s-ar putea înţelege apariţia în ţesuturile vii tratate cu inhibitori metabolici a unei noi cantităţi de substanţe hidrosolubile libere.

După teoria sorbţiei, protoplasma vie este un coacervat complex a cărui apă în totalitatea ei este „legată" şi se deosebeşte ca stare şi însuşiri de apa obişnuită, comportîndu-se ca o fază aparte, ca un solvent mai slab (Nasonov [16], Macovschi [7], [8]). Această teorie nu este nici ea în stare să prevadă şi să explice fenomenul menţionat, deoarece coacervatele se formează spontan, fără a necesita vreun consum de energie. De aceea

prezența inhibitorilor metabolici, mai ales în concentrații slabe, nu poate influența stabilitatea coacervatelor și nu poate provoca eliberarea din coacervate a apei și a altor substanțe cuprinse în acestea.

Ipoteza asociației inducției despre alcătuirea materiei vii susține că apa protoplasmei este numai în parte liberă deoarece majoritatea ei este adsorbită, polarizată și orientată la nivelul proteinelor protoplasmatice (Ling [3], [4]). Adsorbția apei se face însă cu degajare de energie. Prin urmare, inhibitorii metabolici, care micșorează producerea de energie în țesuturile vii, nu pot provoca desorbția apei de pe proteinele protoplasmatice pentru a mări proporția apei libere în țesut. Cu atît mai puțin inhibitorii metabolici ar putea provoca apariția în țesuturile vii a unor noi cantități de substanțe hidrosolubile libere, problemă de care ipoteza asociației inducției pînă acum nici nu s-a preocupat.

Rezultă că, în conformitate cu teoriile și cu ipoteza menționată, toate bazate pe concepția moleculară despre alcătuirea materiei vii, proporția de apă liberă și de substanțe hidrosolubile în țesuturi în nici un caz nu ar putea fi modificată de inhibitorii metabolici. Cu alte cuvinte, fenomenul prevăzut de teoria biostructurii ar fi cu desăvîrșire exclus.

Rămînea de văzut dacă cercetările experimentale, care urmau să fie efectuate anume în vederea căutării fenomenului menționat, vor duce sau nu la descoperirea lui. În primul caz, această descoperire urma să constituie o confirmare a valabilității teoriei biostructurii și să aducă prima dovadă experimentală de netăgăduit pentru existența materiei biostructurate în materialul biologic viu. În cel de al doilea caz, rezultatele negative ale acestor cercetări urmau să infirme concepția biostructurală.

★

Pentru a verifica dacă în țesuturile vii tratate cu inhibitori metabolici se produce o eliberare de apă și de substanțe hidrosolubile, s-au efectuat cercetări pe material biologic viu, atît de proveniență vegetală (frunzele vii de porumb), cît și de proveniență animală (nervii sciatici vii de broască), utilizîndu-se doi inhibitori metabolici: unul de natură organică (2,4-dinitrofenolul), iar altul de natură anorganică (azida de sodiu).

În cele ce urmează vor fi prezentate întîi rezultatele cercetărilor efectuate pe frunze, apoi ale celor efectuate pe nervi.

A. CERCETĂRI EFECTUATE PE FRUNZE VII

Dacă inhibitorii metabolici introduși în frunzele vii vor provoca sporirea cantității de apă liberă și de substanțe hidrosolubile libere, atunci:

1. Prin stoarcere la presiuni hidrostatice mari, frunzele tratate cu soluții de inhibitori metabolici ar urma să dea o cantitate mai mare de suc vacuolar decît frunzele-martor tratate numai cu apă, cu o cantitate de substanțe dizolvate sporită față de aceea din sucul martor; totodată, ar trebui ca introducerea în frunzele vii a unor substanțe lipsite de însușirile specifice ale inhibitorilor metabolici să nu fie urmată de aceste efecte.

2. În frunzele vii tratate cu soluţii de inhibitori metabolici, proporţia apei libere ar urma s-o depăşească pe aceea din frunzele-martor tratate numai cu apă sau cu soluţii de substanţe care nu se comportă ca inhibitorii de felul menţionat.

3. Viteza de evaporare a apei din frunzele vii tratate cu soluţii de inhibitori metabolici ar trebui să difere de aceea a apei din frunzele-martor tratate numai cu apă sau cu soluţii de substanţe care nu au însuşirile acestor inhibitori. În cazul cînd surplusul de apă liberă apărut datorită inhibitorilor ar depăşi surplusul substanţelor hidrosolubile, concentraţiile lichidului intracelular ar trebui să scadă, tensiunea lui de vapori să crească, iar viteza de evaporare a apei din frunză să devină mai mare. În cazul invers, cînd inhibitorii metabolici ar provoca o sporire mai însemnată a cantităţii substanţelor hidrosolubile libere decît a cantităţii de apă liberă, concentraţia lichidului intracelular ar trebui să crească, tensiunea lui de vapori să scadă, iar viteza de evaporare a apei din frunze să se micşoreze. Dacă însă între cantitatea suplimentară de apă liberă şi cea de substanţe hidrosolubile ce se eliberează prin destrămarea biostructurii sub influenţa inhibitorilor metabolici ar exista acelaşi raport ca între apa liberă şi substanţele hidrosolubile aflate iniţial în lichidul intracelular, atunci, desigur, ar trebui să nu se modifice nici concentraţia acestui lichid, nici tensiunea lui de vapori şi nici viteza de evaporare a apei.

Plecînd de la consideraţiile de mai sus, s-au efectuat trei serii de cercetări, folosind procedee de investigaţie diferite, şi anume:

— măsurarea şi analiza sucului vacuolar stors din frunzele vii netratate şi tratate cu inhibitori metabolici;

— dozarea proporţiei de apă liberă în frunzele netratate şi în cele tratate cu inhibitori metabolici;

— măsurarea vitezei de evaporare a apei din frunzele vii netratate şi tratate cu inhibitori metabolici.

În cele ce urmează vom prezenta, pe rînd şi pe scurt, modul de desfăşurare a acestor cercetări, principalele rezultate obţinute şi concluziile care s-au desprins din ele.

1. Cantitatea şi concentraţia sucului vacuolar obţinut din frunzele vii netratate şi tratate cu inhibitori metabolici

Plantule de porumb (hibridul simplu 301) în vîrstă de 17—23 de zile, crescute în seră, s-au tăiat de la colet, iar frunzele s-au legat în mănunchiuri de cîte 50,0 g şi s-au introdus cu baza lor în soluţii apoase de 2,4-dinitrofenol (10^{-3} M) sau azidă de sodiu (10^{-2} M). După 24 de ore, frunzele îşi păstrau aspectul normal, deşi în ele pătrundeau cantităţi apreciabile de inhibitori; numai bazele lor, cufundate în soluţii, prezentau semne de intoxicaţie. Plantulele martor au fost prelucrate la fel, cu deosebirea că frunzele lor s-au introdus în apă distilată.

După 24 de ore de la începutul experienţei, frunzele se scoteau din soluţii, respectiv din apă, baza lor se spăla cu apă distilată, fără ca apa să atingă limbul frunzelor, se uscau prin tamponare cu hîrtie de filtru şi se cîntăreau la balanţa farmaceutică. Dacă greutatea frunzelor

tratate cu inhibitori nu era egală cu aceea a frunzelor-martor, frunzele care cîntăreau mai mult erau lăsate să se usuce la temperatura camerei pînă la greutatea celorlalte.

Apoi frunzele se storceau într-o presă hidraulică de laborator tip Hafico, modelul de 2 litri, prevăzută cu dispozitivul special pentru cantități mici de material vegetal. Presiunea se ridica treptat pînă la 150 atm și se menținea pînă cînd materialul înceta să mai cedeze suc (15 min erau în general de ajuns).

Cantitatea de suc vacuolar obținută se măsura cu cilindrul gradat și se exprima în ml.

După centrifugare la 12 000 rot/min timp de 30 min, se determina indicele de refracție al sucului, iar concentrația lui se exprima convențional în g de zaharoză la 100 ml suc.

Unele rezultate sînt prezentate în tabela 1.

Tabela 1

Volumul (ml) și conținutul în substanțe hidrosolubile (exprimat convențional în g zaharoză) al sucului vacuolar obținut prin stoarcerea la 150 atm a frunzelor vii de porumb tratate cu apă distilată (frunzele-martor) sau cu soluții de 2,4-dinitrofenol (DNP) (10^{-3} M) și de azidă de sodiu (NaN_3) (10^{-2} M). Durata tratamentului: 20 ore la 20–22°C.

Nr. exp.	Data exp.	Volumul sucului vacuolar (ml)			Substanțe hidrosolubile din suc (g zaharoză)		
	1968	apă	DNP	NaN_3	apă	DNP	NaN_3
1	11.IX.	13	22	27	0,10	0,31	0,54
2	24.IX.	13	23	25	0,18	0,38	0,54
3	1.X.	13	21	26	0,16	0,45	0,74

Se constată că frunzele vii, tratate cu soluții de 2,4-dinitrofenol sau de azidă de sodiu, dau o cantitate mai mare de suc vacuolar decît frunzele-martor tratate cu apă.

Cum apa sucului vacuolar reprezintă în primă aproximație apa liberă stoarsă din frunzele vii, obținerea unei cantități sporite de suc din frunzele tratate cu inhibitori metabolici arată că în aceste frunze există mai multă apă liberă decît în frunzele-martor. Surplusul sucului vacuolar și deci al apei libere din frunzele tratate cu inhibitori demonstrează că la apa liberă existentă în frunzele-martor se adaugă o nouă cantitate de apă liberă, apărută în frunze datorită prezenței inhibitorilor menționați.

Se mai constată că sucul vacuolar stors din frunzele tratate cu soluții diluate de 2,4-dinitrofenol și de azidă de sodiu conține substanțe hidrosolubile în cantitate mai mare decît sucul vacuolar stors din frunzele-martor, tratate numai cu apă.

Cum substanțele hidrosolubile din sucul vacuolar reprezintă în primă aproximație substanțe dizolvate în apa liberă a frunzelor vii, prezența unei cantități sporite a acestor substanțe în sucul vacuolar stors din frunzele tratate cu inhibitori metabolici arată că în aceste frunze există o cantitate de substanțe hidrosolubile libere mai mare decît în frunzele-martor (Macovschi și Frunzeti [9]).

Concluzie. Frunzele vii de porumb tratate cu inhibitori metabolici, ca 2,4-dinitrofenolul sau azida de sodiu, conțin o cantitate sporită de

apă liberă şi de substanţe hidrosolubile dizolvate în ea în comparaţie cu frunzele-martor.

Pentru a verifica dacă ambele efecte se datoresc într-adevăr unei acţiuni specifice a inhibitorilor metabolici şi nu faptului că apa distilată (folosită la frunzele-martor) a fost înlocuită cu o soluţie, s-au efectuat experienţe asemănătoare celor de mai sus, dar în care în locul soluţiilor de inhibitori metabolici s-au introdus în frunzele de porumb soluţii de concentraţii similare (10^{-2} M) ale unor substanţe răspîndite în plantă, şi anume de zaharoză (neelectrolit) şi de d,l-alanină (electrolit). Unele dintre rezultatele astfel obţinute sînt prezentate în tabela 2 şi arată că, spre deosebire de inhibitorii menţionaţi, aceste substanţe nu modifică

Tabela 2

Volumul (ml) şi conţinutul în substanţe hidrosolubile (exprimat convenţional în g „aharoză) al sucului vacuolar obţinut prin stoarcerea la 150 atm a frunzelor vii de porumb tratate cu apă distilată (frunzele-martor) sau cu soluţii de zaharoză (Z) (10^{-2} M) şi d,l-alanină (Ala) (10^{-2} M). Durata tratamentului: 20 ore la 20–22°C.

Nr. exp.	Data exp.	Volumul sucului vacuolar (ml)			Substanţe hidrosolubile din suc (g zaharoză)		
	1970	Apă	Z	Ala	apă	Z	Ala
1	4.X.	16	16	15	0,18	0,16	0,17
2	6.X.	16	17	15	0,15	0,16	0,15
3	16.X.	18	19	18	0,21	0,20	0,21

apreciabil nici volumul de suc vacuolar ce se obţine din frunze şi nici cantitatea substanţelor dizolvate în acest suc. Prin urmare, frunzele vii de porumb tratate cu soluţii de zaharoză şi de d,l-alanină conţin aceeaşi cantitate de apă liberă şi de substanţe dizolvate în ea ca şi în frunzele-martor, tratate cu apă distilată. Rezultatul acesta întăreşte concluzia de mai sus, demonstrînd că sporirea cantităţii de apă liberă şi de substanţe hidrosolubile libere în frunzele de porumb tratate cu inhibitori metabolici se datoreşte într-adevăr acestor inhibitori şi nu faptului că în locul apei distilate au fost introduse în frunze soluţii de o anumită concentraţie (Macovschi şi Frunzeti [9]).

2. Apa liberă în frunzele vii netratate şi tratate cu inhibitori metabolici

Plantulele de porumb (hibrid simplu 301) în vîrstă de 14 zile, crescute în seră, s-au tăiat de la colet, iar bazele frunzelor s-au introdus în soluţii apoase de 2,4-dinitrofenol (10^{-3} M) şi de azidă de sodiu (10^{-2} M). Plantulele-martor s-au prelucrat la fel, cu deosebirea că frunzele lor s-au introdus în apă distilată, respectiv în soluţie de zaharoză (10^{-2} mol). După 24, respectiv 48 de ore (numai frunzele tratate cu azida de sodiu au prezentat după 48 de ore de tratament semne de intoxicaţie), se proceda la dozarea apei libere din frunze după metoda Marincik-Okuntzov [12]. În acest scop, probe de cîte 1,0 g de frunze, tăiate transversal în fîşii de 4 mm lungime, se introduceau în fiole de cîntărire şi peste ele se adăugau 2,5 ml soluţie de zaharoză 25%. Apa liberă din frunze dilua soluţia de zaharoză. După 3 ore se determina indicele de refracţie al so-

luției, se calcula concentrația finală a zaharozei și cantitatea apei libere din frunze, exprimînd aceasta din urmă în procente față de apa totală a frunzelor, determinată prin uscarea frunzelor la 105°C.

Unele din rezultatele obținute sînt prezentate în tabela 3.

Tabela 3

Apa liberă (% față de apa totală) în frunzele vii de porumb tratate cu apă distilată sau cu soluție de zaharoză (Z) 10^{-2} M), de 2,4-dinitrofenol (DNP) (10^{-3} M), respectiv de azidă de sodiu (NaN_3)(10^{-2}M). Durata tratamentului: 24, respectiv 48 ore la 20—21°C.

Durata tratamentului	Apa liberă în frunze (% față de apa totală)			
	apă	Z	DNP	NaN_3
24	25	26	32	33
48	33	32	38	37

Se constată că în frunzele vii de porumb tratate cu soluții de 2,4-dinitrofenol și de azidă de sodiu proporția apei libere este cu mult mai mare decît în frunzele-martor tratate cu apă distilată, respectiv cu soluție de zaharoză. Acest surplus de apă liberă arată că la apa liberă existentă în frunze se adaugă o nouă cantitate de apă liberă apărută în frunze datorită prezenței în ele a inhibitorilor metabolici (Rabega și Stănescu [17]).

Concluzie. Frunzele vii de porumb tratate cu inhibitori metabolici, ca 2,4-dinitrofenol sau azidă de sodiu, conțin o cantitate sporită de apă liberă în comparație cu frunzele-martor.

3. Evaporarea apei din frunzele vii netratate și tratate cu inhibitori metabolici

Frunze de plantule de porumb (hibrid simplu 301 și hibrid dublu 409) în vîrstă de 14—17 zile, crescute în seră, erau infiltrate prin metoda Kursanov [1] fie cu apă distilată, fie cu o soluție de zaharoză (10^{-2} M), de d,l-alanină (10^{-2} M), de 2,4-dinitrofenol (10^{-3} M) sau de azidă de sodiu (10^{-2} M). Apoi, după îndepărtarea apei, respectiv a soluțiilor de pe partea externă a frunzelor, prin tamponarea acestora cu hîrtie de filtru, frunzele au fost înșirate pe ață și se cîntăreau din oră în oră. Între cîntăriri, ața se întindea între două stative, așa că apa din frunze se evapora liber în aer la temperatura laboratorului (20—21°C).

Unele din rezultatele obținute sînt prezentate în tabela 4.

Se constată că, în același interval de timp, frunzele infiltrate cu inhibitori metabolici pierd din greutate mai puțin decît cele infiltrate cu apă, cu zaharoză sau cu d,l-alanină. Prin urmare, viteza de evaporare a apei din frunzele infiltrate cu inhibitori metabolici este considerabil mai mică decît în cazul tuturor celorlalte variante experimentale. Or, se știe că viteza de evaporare a solventului dintr-o soluție depinde de tensiunea de vapori a soluției, iar aceasta, la rîndul ei, depinde de concentrație: cu cît concentrația soluției este mai mare, cu atît tensiunea de vapori este mai mică și evaporarea solventului mai înceată. Prin urmare, faptul că frunzele infiltrate cu inhibitori metabolici pierd din greu-

Tabela 4

Evaporarea apei din frunzele de porumb infiltrate cu apă distilată sau cu soluție de zaharoză (Z) (10^{-2})M, de d,l-alanină (Ala) (10^{-2} M), de 2,4-dinitrofenol(DNP) (10^{-3} M), respectiv de azidă de sodiu (NaN_3) (10^{-2} M) cu apă distilată. Temperatura: 20–21°C.

Timpul după infiltrare (ore)	Frunze infiltrate (g)				
	apă	Z	Ala	DNP	NaN_3
0	1,75	1,78	1,78	1,79	1,72
1	1,40	1,42	1,44	1,65	1,56
2	1,10	1,12	1,15	1,54	1,44
3	0,89	0,92	0,93	1,42	1,32
Apă evaporată în decurs de 3 ore (g)	0,86	0,86	0,85	0,37	0,40

tate mai încet decît celelalte arată că în ele concentrația soluției intracelulare este mai mare (Macovschi și Rabega [11]).

Concluzie. Frunzele vii de porumb tratate cu inhibitori metabolici, ca 2,4-dinitrofenolul sau azida de sodiu, conțin substanțe hidrosolubile libere în concentrație mai mare decît frunzele-martor.

Este de menționat că această concluzie concordă cu rezultatele cercetărilor prezentate în tabela 1 și că ea putea fi prevăzută pe baza acestor rezultate. Într-adevăr, datele cuprinse în tabela 1 arată că în prezența inhibitorilor metabolici cantitatea de substanțe hidrosolubile din sucul vacuolar (exprimată convențional în g de zaharoză) crește relativ mai mult decît cantitatea însăși de suc vacuolar (exprimată în ml). Așa, de exemplu, chiar în experiența nr. 1 din 11 septembrie 1968, 2,4-dinitrofenolul face să crească proporția substanțelor hidrosolubile în sucul vacuolar al frunzelor de porumb de 0,31 : 0,10 = 3,1 ori, pe cînd volumul sucului vacuolar crește în proporție de numai 22 : 13 = 1,7 ori. Prin urmare, conform datelor cuprinse în tabela 1, în frunzele vii de porumb inhibitorii metabolici provoacă creșterea concentrației substanțelor hidrosolubile libere, adică exact ceea ce se exprimă în concluzia la care ne-am referit.

B. CERCETĂRI EFECTUATE PE NERVI VII

Cercetarea acțiunii inhibitorilor metabolici asupra nervilor vii s-a făcut în alte condiții experimentale și prin urmărirea altor fenomene decît la frunze. Nervii au fost imersați în soluții izotonice (Ringer) ce conțineau inhibitori. Inhibitorii pătrundeau în nervi și provocau fenomene capabile să determine un schimb de apă și de alte substanțe între nervi și mediul de imersie.

Se poate intui că, dacă surplusul de apă liberă apărut în nervi datorită inhibitorilor metabolici ar depăși surplusul de substanțe hidrosolubile, concentrația soluției intracelulare ar urma să scadă, iar în acest caz, mediul intern al nervului devenind hipotonic în raport cu mediul extern, o parte din apa liberă va ieși din nerv pînă la restabilirea echilibrului osmotic, deci cantitatea totală de apă din nervi va scădea.

Dacă însă, datorită acțiunii inhibitorilor metabolici, cantitatea de substanțe hidrosolubile libere ar crește în măsură mai mare decît cea de apă liberă, concentrația soluției intracelulare va crește, iar mediul intern al nervilor devenind hipertonic în raport cu mediul exterior, o parte din apa soluției în care nervii sînt imersați va pătrunde în nervi pînă la restabilirea echilibrului osmotic, deci cantitatea totală de apă din nervi va crește.

Bineînțeles, în cazul cînd între cantitatea suplimentară de apă liberă și cea de substanțe hidrosolubile eliberate sub influența inhibitorilor metabolici ar exista același raport ca între apa liberă și substanțele hidrosolubile aflate inițial în soluția intracelulară, schimbul de apă cu mediul exterior nu va avea loc.

Pentru simplificarea acestor deducții s-a insistat numai asupra schimburilor de apă, neglijîndu-se schimburile altor substanțe între nervi și mediul de imersie.

Or, dacă inhibitorii metabolici pătrunși în nervii vii provoacă sporirea cantității de apă liberă și de substanțe hidrosolubile libere, urmată de un schimb de apă între nervi și mediul în care ei sînt imersați, atunci :

1. La nervii tratați cu inhibitori metabolici, spectrele RMN de înaltă rezoluție ale apei ar urma să prezinte deosebiri față de spectrele corespunzătoare obținute la nervii-martor sau tratați cu substanțe care nu au însușirile acestor inhibitori ; o modificare a lățimii acestor spectre va corespunde unei schimbări a raportului dintre apa „organizată" și apa liberă a nervilor, iar modificarea suprafeței lor va indica schimbarea conținutului de apă totală al acestora.

2. La nervii tratați cu inhibitori metabolici, timpii de relaxare RMN ai protonilor apei ar urma să difere de cei înregistrați atît la nervii-martor, cît și la cei tratați cu substanțe care nu se comportă ca inhibitori metabolici ; aceste modificări ale timpilor de relaxare pot indica și ele schimbările ce survin în starea apei din nervi, aducînd eventual unele informații suplimentare.

În consecință, s-au efectuat două serii de cercetări, folosind procedee de investigație diferite, și anume :

— determinări de rezonanță magnetică nucleară de înaltă rezoluție ;

— determinări de rezonanță magnetică nucleară ecou de spin.

În cele ce urmează vom prezenta pe rînd și pe scurt modul de desfășurare a acestor cercetări, principalele rezultate obținute și concluziile care s-au desprins din ele.

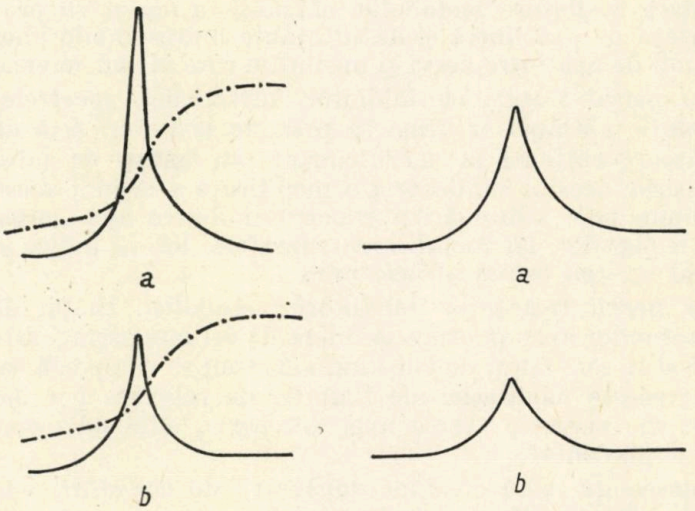
1. Spectrele RMN de înaltă rezoluție ale apei din nervii vii, netratați și tratați cu inhibitori metabolici

Nervii sciatici prelevați de la broaște (*Rana ridibunda* Pall) s-au imersat imediat după disecție în soluția Ringer cu pH=7,3—7,4 timp de 20 min. Fiecare nerv era apoi tamponat cu hîrtie de filtru pentru îndepărtarea soluției Ringer de pe suprafața lui și montat în poziția longitudinal-centrală în tubul de probă al unui spectrometru RMN Varian A-60 A. Odată nervul montat, tubul de probă era umplut cu hexametil

disiloxan (silicon, lichid vîscos care nu conține apă și al cărui spectru RMN este mult depărtat pe linia frecvențelor de cel al apei) pentru crearea omogenității mediului din tub și introdus în cavitatea de rezonanță a spectrometrului RMN. Prin manipularea spectrometrului se obținea pe hîrtia înregistratoare atît spectrul RMN corespunzător protonilor apei din nerv, cît și integrala asociată a lui.

După trasarea spectrului, nervul se scotea din tubul de probă și se imersa timp de aproape 10 min într-o soluție Ringer ce conținea 2,4-dinitrofenol în concentrație de 5 mM (pH = 7,3 — 7,4). Apoi nervul, scos din soluție, se remonta în tubul de probă, procedîndu-se la fel ca mai înainte. Astfel se obținea spectrul RMN al apei nervului tratat cu 2,4-dinitrofenol.

Unele dintre rezultatele obținute în acest fel sînt prezentate în figura 1.



Broasca 1 Broasca 2

Fig. 1. — Spectrele RMN de înaltă rezoluție ale apei nervului sciatic de broască netratat (*a*) și apoi tratat (*b*) cu 2,4-dinitrofenol prin imersare timp de 10 min în soluție Ringer care conține a 2,4-dinitrofenol în concentrație de 5 mM. La broasca *1*, lățimea spectrelor la jumătatea înălțimii este aceeași în ambele cazuri (*a*) și (*b*), și anume 12 cps. La broasca *2*, lățimea spectrelor la jumătatea înălțimii este de 24 cps (*a*) și 12 cps (*b*). Baleiajul : 500 cps.

Măsurînd lățimea la jumătatea înălțimii celor două spectre RMN obținute pe nervul sciatic al broaștei *1*, se constată că ea este aceeași. Prin urmare, în acest caz, tratamentul nervului cu 2,4-dinitrofenol nu a modificat raportul dintre apa „organizată" și apa liberă a nervului.

În schimb, evaluarea integralelor celor două spectre arată că după tratarea nervului cu 2,4-dinitrofenol integrala spectrului RMN scade

cu 13% față de valoarea inițială. Cum integrala oglindește apa totală aflată în nerv, înseamnă că sub influența 2,4-dinitrofenolului aceasta din urmă a scăzut cu 13%, adică 13% din apa totală a ieșit din nerv în mediul de îmbăiere în timpul cît nervul a fost imersat în soluția Ringer cu 2,4-dinitrofenol. Cum din nerv poate ieși numai apa liberă și cum după tratarea cu 2,4-dinitrofenol raportul dintre apa „organizată" și apa liberă din nerv a rămas același, rezultă că în prezența acestui inhibitor o parte din apa „organizată" a fost eliberată (Macovschi și Mosora [10], Mosora [13], [14]).

Concluzie. Nervii sciatici vii de broască tratați cu inhibitorul metabolic 2,4-dinitrofenol eliberează o parte din apa lor „organizată".

Proporția apei eliberate poate fi calculată pe baza următorului raționament: scăderea integralei cu 13% arată că, în urma tratării cu 2,4-dinitrofenol, conținutul total de apă al nervului a scăzut la 87% din valoarea sa inițială. Or, din moment ce cu toată această scădere raportul dintre apa „organizată" și apa liberă care a mai rămas în nerv nu s-a schimbat, înseamnă că valoarea finală a_f a conținutului de apă „organizată" din nervul tratat cu 2,4-dinitrofenol trebuie să fie egală cu 87% din valoarea inițială a_i a acestui conținut:

$$a_f = \frac{87}{100} a_i.$$

Prin urmare, sub influența inhibitorului metabolic 2,4-dinitrofenol, conținutul de apă „organizată" al nervului a scăzut și el cu 13%.

Măsurînd lățimea celor două spectre RMN obținute cu nervul sciatic al broaștei *2*, la jumătatea înălțimii lor se constată că ea nu este aceeași, și anume: după tratare cu 2,4-dinitrofenol (spectrul *b*), ea este mai mică decît la nervul netratat (spectrul *a*). Aceasta înseamnă că sub acțiunea 2,4-dinitrofenolului proporția apei libere din nerv a crescut. Dar și în acest caz o parte din apa liberă a ieșit din nerv atunci cînd acesta a fost imersat în soluția Ringer ce conținea 2,4-dinitrofenol. Dovada: suprafața spectrului RMN al nervului tratat cu 2,4-dinitrofenol este mai mică decît înainte de tratament. Aici diferența este atît de vizibilă, încît nici nu era nevoie să se traseze integralele asociate spectrelor. Prin urmare, rezultatele obținute duc la aceeași concluzie ca și în cazul determinărilor efectuate cu nervul sciatic al broaștei *1*.

Pentru a verifica dacă modificarea traseului spectrelor RMN ale protonilor apei la nervii tratați cu 2,4 dinitrofenol se datorește efectiv acestui inhibitor metabolic, au fost efectuate unele cercetări în cadrul cărora în locul 2,4 dinitrofenolului s-au folosit, ca și în cazul cercetărilor pe frunze, zaharoza și d,l-alanina. Experiențele s-au făcut însă nu pe cîte un singur nerv, ci pe grupuri de cîte 10 nervi așezați ghemuit în tubul de probă al spectrometrului, pentru ca prin mărirea masei de material supus cercetării să se surprindă mai lesne eventualele modificări în starea apei nervilor provocate de cele două substanțe. Tot în același scop, durata imersiunii nervilor în soluțiile Ringer ce conțineau fie zaharoză, fie d,l-alanină în concentrație de 5 mM (deci în aceeași concentrație molară ca și 2,4-dinitrofenolul) a fost mărită la 180 min. Cu toate aces-

tea, s-a constatat că, spre deosebire de 2,4-dinitrofenol, nici una din aceste substanţe nu exercită vreun efect asupra spectrelor RMN de înaltă rezoluţie, date de protonii apei nervilor sciatici vii (Mosora [13], [14]).

2. Timpii de relaxare RMN ai protonilor apei din nervii vii, netrataţi şi trataţi cu inhibitori metabolici

Imediat după disecţie, 10 nervi de broască (*Rana ridibunda* Pall) au fost imersaţi timp de 180 min. în soluţie Ringer cu pH=7,3—7,4, iar după îngrijită tamponare cu hîrtie de filtru pentru îndepărtarea resturilor de soluţie Ringer de pe suprafaţa lor au fost introduşi în poziţia ghemuită în tubul de probă al relaxometrului spin-ecou, construit la Facultatea de fizică a Universităţii din Bucureşti (Levai şi Borşan [2]). După introducerea acestui tub în cavitatea de rezonanţă a relaxometrului, prin manipularea aparatului se vizualizau pe ecranul osciloscopului ecourile de spin, care se fotografiau. Manipulînd din nou aparatul, se realiza pe ecranul osciloscopului vizualizarea semnalului de stingere a precesiei libere, citindu-se direct la aparat valoarea timpului τ la care semnalul de spin-ecou nu mai apărea.

După aceea nervii erau scoşi din tubul de probă şi imersaţi într-o soluţie Ringer ce conţinea 2,4-dinitrofenol în concentraţia 5 mM timp de aproximativ 15 min. După tamponarea cu hîrtie de filtru erau reintroduşi în tubul de probă ca mai înainte. Se fotografia din nou stingerea ecourilor de spin şi din nou se citea la aparat valoarea timpului τ la care semnalul spin-ecou nu mai apărea.

Ca şi în cercetările referitoare la spectrele RMN de înaltă rezoluţie s-au făcut şi aici determinări de control, înlocuindu-se soluţia Ringer ce conţinea 2,4-dinitrofenol cu soluţie Ringer conţinînd fie zaharoză, fie d,l-alanină în concentraţia 5 mM. Pentru aceste determinări, timpul de imersie a fost prelungit la 180 min.

Unele dintre rezultatele obţinute în experienţele cu 2,4-dinitrofenol sînt prezentate în figura 2.

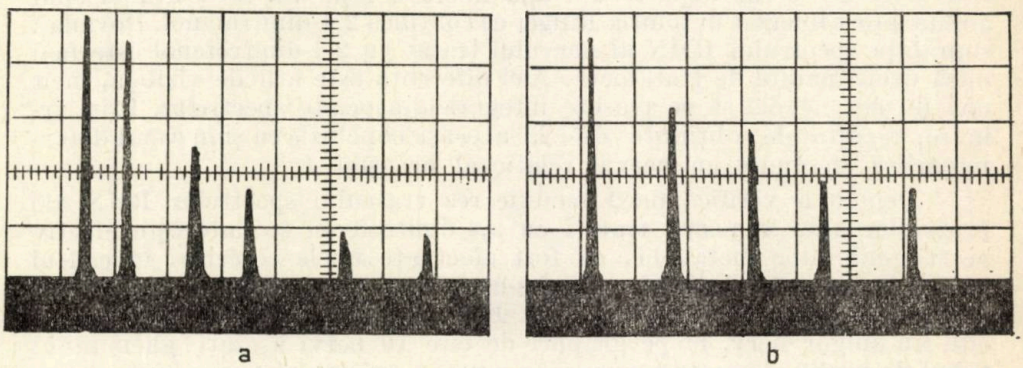


Fig. 2. — Semnalele de spin-ecou pentru măsurarea timpului T_2 obţinute la impulsuri $\frac{\pi}{2}$, τ, π (τ variabil) în cazul apei unui grup de 10 nervi sciatici vii de broască netrataţi şi trataţi cu 2,4-dinitrofenol prin imersare timp de 15 min în soluţia Ringer care conţinea DNP în concentraţia 5 mM.

a — Nervii netrataţi: T_2 — 0,0233 ; baza de timp — $1{,}75.10^2$ μ/s mm; *b* — aceiaşi [nervi trataţi: T_2—0,0412; baza de timp - $3{,}3.10^2$ μs/mm. Sincronizarea oscilografului s-a făcut cu impulsul π.

După fotografia ce reprezintă stingerea ecourilor de spin, mărită la o scară favorabilă, se calcula cu ajutorul programului realizat la calculatorul electronic ICL-1900 timpul de relaxare spin-spin T_2 după formula

$$T_2 = \frac{2(t_a - t_b)}{\ln \frac{A_a}{A_b}}.$$

În această formulă, A_a și A_b sînt amplitudini a două semnale de spin ecou, iar $t_a - t_b$ diferențe de timp între apariția semnalelor respective. Pentru calculul valorii T_2 medii se foloseau toate variantele posibile privind amplitudinea semnalelor și diferențele de timp dintre ele.

Timpul de relaxare spin-rețea T_1 se calcula pe baza timpului τ după formula

$$T_1 = \frac{\tau}{\ln 2}.$$

Valorile obținute pentru T_2 și T_1 sînt prezentate în tabela 5.

Tabela 5

Timpii de relaxare spin-spin (T_2) și spin-rețea (T_1) ai protonilor apei din nervii sciatici vii de broască imersați mai întîi în soluție Ringer (martor), apoi în soluție Ringer conținînd fie 2,4-dinitrofenol în concentrație de 5 mM (imersare timp de 15 min), fie zaharoză sau d,l-alanină în concentrație de 5 mM (imersare timp de 180 min); valori medii din mai multe experiențe.

Substanța aplicată	Timpii de relaxare			
	spin-spin T_2 (s)		spin-spin T_1 (s)	
	martor	tratat	martor	tratat
2,4-Dinitrofenol	0,0212	0,0500	0,218	0,235
2,4-Dinitrofenol	0,0113	0,0405	0,136	0,139
Zaharoză	0,0154	0,0160	0,194	0,177
d,l-Alanină	0,0228	0,0221	0,264	0,279

Se constată că timpul de relaxare spin-spin T_2 al protonilor apei din nervii tratați cu 2,4-dinitrofenol prezintă valori crescute față de timpul de relaxare T_2 al protonilor apei acelorași nervi netratați cu acest inhibitor sau ai apei nervilor tratați cu soluția Ringer conținînd zaharoză sau d,l-alanină. În schimb, chiar la nervii tratați cu 2,4-dinitrofenol, timpul de relaxare spin-rețea T_1 rămîne în limitele valorilor obținute pentru nervii tratați numai cu soluția Ringer (martor) sau cu soluția Ringer conținînd și zaharoză sau d,l-alanină.

Creșterea timpului de relaxare T_2 în cazul acțiunii 2,4-dinitrofenolului, ca și invarianța timpului de relaxare T_1, pot fi explicate cu ajutorul modelului bifazic (Zimmermann și Brittin [19]). Acest model, aplicat la celulele vii, presupune prezența atît a unei fracțiuni de apă protoplasmatică într-o fază oarecum „solidă" (organizată), în care mișcarea rotațională a moleculelor apei este restrînsă, cît și a unei fracțiuni de apă

aflate în stare lichidă. Dacă faza „solidă" contribuie în cea mai mare măsură la viteza de relaxare transversală şi dacă faza lichidă a apei tinde să domine viteza de relaxare longitudinală, atunci este explicabilă atît variaţia timpului T_2, cît şi invarianţa timpului T_1 la nervii sciatici vii de broască supuşi acţiunii 2,4-dinitrofenolului. Într-adevăr, creşterea timpului T_2 demonstrează scăderea fazei „solide" a apei, adică eliberarea unei părţi din apă aflate în această fază, pe cînd timpul T_1, aparţinînd în cea mai mare parte apei în fază lichidă, rămîne practic neschimbat (Mosora [15]).

Concluzie. 2,4-dinitrofenolul pătruns în nervii sciatici vii de broască provoacă eliberarea unei părţi de apă aflate în starea „solidă" (organizată).

Această concluzie, după care eliberarea unei părţi de apă organizate a nervului se datoreşte inhibării biochimismului acestuia de către 2,4-dinitrofenol, este întărită de rezultatele obţinute după imersarea nervilor în soluţii Ringer conţinînd zaharoză sau d,l-alanină (tabela 5) (Mosora [15]).

Rezultatele celor cinci serii de cercetări, trei serii efectuate pe frunze vii şi două serii efectuate pe nervi vii, sînt concordante. Faptul acesta este cu atît mai remarcabil, cu cît în cadrul fiecărei serii de cercetări s-a aplicat cîte o metodă de investigaţie cu totul diferită de la o serie la alta.

Pe aceste căi diferite s-a putut demonstra că înhibitorii metabolici pătrunşi în ţesuturile vii provoacă eliberarea unor cantităţi însemnate de apă şi de substanţe hidrosolubile, fenomen care nu a fost cunoscut pînă acum şi care nu poate fi explicat de pe poziţiile teoriilor şi ipotezelor actuale, bazate pe concepţia moleculară despre alcătuirea materiei vii. Astfel rezultatele cercetărilor experimentale au confirmat întru totul una din prevederile fundamentale ale teoriei biostructurii, după care existenţa materiei biostructurate depinde de aportul de energie biochimică, ceea ce explică de ce inhibitorii metabolici introduşi în ţesuturile vii determină destrămarea parţială a acestei materii, cu eliberarea de apă şi de substanţe hidrosolubile.

Prin urmare, teoria biostructurii este justă şi materia biostructurată există.

Prezentat la redacţie la 20 aprilie 1971

Institutul de biochimie
şi
Catedra de biochimie a
Facultăţii de biologie,
Universitatea Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. A.L. Kursanov, *Obratimoe deistvie fermentov v jivoi rastitelnoi klemka*, Izd. AN SSSR, Moskva, 1940 (vezi A. N. Beloserski, N. I. Proskurjakov, *Praktikum der Biochemie der Pflanzen*, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 1956, p. 305, respectiv

Prakticeskoe rukovodstvo po biohimii rastenii, Gos. izd. „Sovetskaia Nauka", Moskva, 1951, p. 293).
2. S. Levai, D. Borșan, Analele Universității București (1971, sub tipar).
3. G. N. Ling, *A physical theory of the living state*, Blaisdall, New York, 1962.
4. G. N. Ling, Int. Rev. Cytol., **26**, 1 (1969).
5. E. Macovschi, Rev. Chimie, **4**, 11 (1959) și în *Materialismul dialectic și științele contemporane ale naturii* (*Materia vie și geneza ei*), Edit. politică, București, 1959.
6. E. Macovschi, St. cerc. biochim., **8**, 253 (1965).
7. E. Macovschi, St. cerc. biochim., **8**, 371 (1965).
8. E. Macovschi, *Biostructura*, Edit. Academiei, București, 1969.
9. E. Macovschi, V. Frunzeti, St. cerc. biochim., **12**, 19 (1969).
10. E. Macovschi, F. Mosora, Rev. roum. biochim., **8**, 97 (1971).
11. E. Macovschi, M. Rabega, St. cerc. biochim., **13**, 219 (1970).
12. A. F. Marincik, M. M. Okuntzov, *Opredelenie sveazanoi vodi*, în C. C. Baslovskaia, O. M. Trubetzkova, *Praktikum po fiziologii rastenii*, Izd. Moskowskogo Universiteta, 1964, p. 297.
13. F. Mosora, Biophysik (1971 a, sub tipar).
14. F. Mosora, Biophysik (1971 b, sub tipar).
15. F. Mosora, Biochimica e biologia sperimentale (1971 c, sub tipar).
16. D. N. Nasonov, *Mestnaia reactzia protoplasmy i rasprostraneaiusscheesea vozbujdenie*, Izd. Acad. Nauk SSSR, Moskva — Leningrad, 1959.
17. C. Rabega, R. Stănescu, Analele Universității din București (1971, sub tipar).
18. T. C. Ruch, J. F. Fulton, *Fiziologie medicală și biofizică*, Edit. medicală, București, 1963.
19. J. R. Zimmermann, W. E. Brittin, J. Phys. Chem., **61**, 1328 (1957).

THE DEMONSTRATION OF BIOSTRUCTURE EXISTENCE

SUMMARY

A new theory is right if it is able to predict and to explain some still unknown phenomena which can neither be predicted nor explained by other theories. For this reason, in order to check the validity of biostructure theory it was taken into account that this theory allows a new phenomenon to be predicted : the increase in free water and walter-soluble compounds within living tissues under the influence of metabolic inhibitors. The membrane and sorption theories as well as the association-induction hypothesis, based on the molecular conception about living matter make-up, do not permit the prediction of such a phenomenon and could explain it if accidentally, it would not have been discovered. In order to learn if the above mentioned phenomenon occurs, five types of experiments were carried out, three of them on living leaves and two on living nerves, to each experimental type, different investigation procedures were applied, viz. measurement and analysis of the vacuolar sap expressed from living leaves either non-treated or treated with metabolic inhibitors, determination of free water and measurement of water removal rate from leaves, determinations of the high resolution nuclear magnetic resonance and the spin echo in living nerves either normal or treated with metabolic inhibitors. Results obtained have permitted the discovery of the phenomenon predicted by the biostructure theory, confirming its predictions in all respects. Thus, both accuracy of the theory and the existence of biostructured matter within living tissues were demonstrated.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 3, 255–262, (1971)

ELIBERAREA APEI, A SUBSTANȚELOR HIDROSOLUBILE ȘI A IONILOR DE POTASIU ȘI CALCIU DIN BIOSTRUCTURA FRUCTELOR DE MĂR ȘI A FRUNZELOR DE VARZĂ ÎN CURSUL PĂSTRĂRII

E. MACOVSCHI și IRINA CORNOIU

Rezumat. — S-a cercetat variația cantității și a compoziției sucurilor vacuolar și plasmatic ce se obțin din fructele de măr și frunzele de varză în cursul păstrării acestora la +4 și +28°C. Pe baza rezultatelor obținute s-a stabilit modul de evoluție a biostructurii materialului vegetal menționat și repercusiunile asupra cantității și compoziției soluției intracelulare. Destrămarea progresivă a biostructurii, urmărită prin cantitatea ionilor de potasiu eliberați, poate constitui un test pentru caracterizarea stării materiei biostructurate în diferitele momente ale păstrării fructelor și legumelor.

Pînă acum s-au efectuat unele cercetări cu privire la comportarea biostructurii țesutului foliar al diferitelor plante sub influența inhibitorilor metabolici [1], [2], a razelor ultraviolete [3], a curentului electric [4] și a temperaturilor ridicate [5]. S-a constatat că, în cazul cînd factorii menționați nu omoară frunzele, biostructura acestora se destramă parțial și reversibil, punînd în libertate o oarecare cantitate din apa și din substanțele hidrosolubile din care este alcătuită. Dacă însă materialul vegetal este omorît, atunci destrămarea biostructurii este totală și nereversibilă.

Influența factorului timp asupra comportării biostructurii fructelor și a legumelor puse la păstrat încă nu a fost cercetată. Or, faptele menționate mai sus sugerează ideea că în cursul păstrării starea biostructurii fructelor și a legumelor evoluează progresiv, în așa fel încît la un moment dat biostructura va începe să se destrame, ceea ce duce la degradarea materialului vegetal și la prăbușirea stocurilor puse la păstrat. Prin urmare, cunoașterea evoluției biostructurii ar putea furniza date utile pentru caracterizarea obiectivă a stării biologice a fructelor și a legumelor puse la păstrat, pentru prevederea momentului prăbușirii stocurilor și pentru stabilirea condițiilor care să permită menținerea cît mai îndelungată a calității organoleptice a fructelor și legumelor în timpul păstrării.

Una dintre metodele de urmărire a comportării biostructurii la materialul vegetal pus la păstrat constă în analiza sucurilor care pot fi stoarse periodic din acest material.

Într-adevăr, după cum rezultă din concepția biostructurală despre natura și alcătuirea materiei vii, sucul care se stoarce din țesuturile vege-

tale vii, numit convenţional „suc vacuolar", reprezintă apa liberă tisulară şi substanţele dizolvate în ea (soluţia intracelulară). Cînd începe destrămarea biostructurii, apa şi substanţele hidrosolubile eliberate se adaugă la apa liberă şi la substanţele hidrosolubile existente în ţesut. De aceea cantitatea sucului vacuolar şi conţinutul lui în substanţe hidrosolubile se modifică, iar această modificare este cu atît mai mare, cu cît destrămarea biostructurii este mai înaintată. Urmărind deci cantitatea şi compoziţia sucului vacuolar stors din cînd în cînd din fructele şi legumele puse la păstrat, s-ar putea stabili atît momentul cînd biostructura începe să se destrame, cît şi modul în care se desfăşoară acest proces.

Reziduul rămas după stoarcerea sucului vacuolar mai conţine biostructură. Dacă va fi pus în condiţii care să permită destrămarea ei lentă, atunci gradul de destrămare şi deci cantitatea şi natura componentelor ce se vor elibera într-o anumită perioadă de timp vor depinde de starea biostructurii; cu cît biostructura este mai slabă şi mai labilă, cu atît mai mare va fi cantitatea substanţelor eliberate în comparaţie cu aceea care s-ar elibera în aceleaşi condiţii dintr-o structură mai viguroasă, aflată într-o stare biologică mai bună. Or, destrămarea biostructurii rămase în reziduul amintit duce la eliberarea apei şi a diferitelor substanţe hidrosolubile aflate în alcătuirea ei. De aceea în reziduuri apare astfel o soluţie care nu a existat înainte şi care, prin stoarcere, dă acum un suc numit convenţional „suc plasmatic". Cantitatea şi compoziţia acestuia depind de starea şi de gradul de destrămare a biostructurii din reziduu. Urmărind deci cantitatea şi compoziţia sucului plasmatic, stors din cînd în cînd din reziduurile fructelor şi legumelor în care s-a provocat destrămarea lentă a biostructurii, se vor obţine informaţii cu privire la starea biostructurii din acest material vegetal şi la evoluţia acestei stări.

Pentru primele cercetări din acest domeniu am ales fructele de măr şi frunzele de varză, păstrate la două temperaturi diferite, şi anume la o temperatură relativ joasă, care să permită păstrarea lor timp mai îndelungat, şi la o temperatură relativ ridicată, la care durata de păstrare să fie scurtă din cauza degradării rapide a materialului vegetal.

MATERIAL ŞI METODE

Cercetările le-am efectuat pe fructe de măr ionatan şi pe frunze din căpăţîni de varză (*Brassica oleraceea*). Materialul de cercetare a fost împărţit în două : o parte a fost păstrată la temperatura de aproximativ +4°C, iar cealaltă la temperatura de aproximativ +28°C. Analizele s-au făcut periodic, la intervale de cîte 10 zile, în decurs de 50 de zile, atît la merele păstrate la +4°C şi la +28°C, cît şi la varza păstrată la +4°C. Numai varza păstrată la temperatura de +28°C nu a mai putut fi analizată după 27 de zile, întrucît s-a degradat.

În timpul prelucrării fructelor de mere se lua o probă medie din trei fructe, în cantitate de 300 g, se tăia în felii şi se storcea în presa hidraulică de laborator tip Hafico, obţinîndu-se sucul vacuolar. Presiunea de stoarcere a fost de 200 atm.

În cazul verzei, se lua o probă medie de 300 g de frunze din întreaga căpăţînă şi se storcea în condiţiile de mai sus.

Reziduurile rămase în presă, atît la mere, cît şi la varză, se ţineau timp de 24 de ore la —10°C, temperatură care nu le omora total. După dezgheţare erau apoi stoarse tot la 200 atm, obţinîndu-se sucul plasmatic.

Volumul sucurilor vacuolare şi plasmatice se măsura, iar apoi sucurile se centrifugau la 6 000 rot/min. În aceste sucuri s-au determinat indicele de refracţie, ionii de potasiu şi de calciu. Cantitatea substanţelor dizolvate în sucuri a fost calculată pe baza datelor refractometrice şi exprimată în g de zaharoză, iar dozarea ionilor de potasiu şi de calciu s-a făcut prin fotometrie în flacără.

REZULTATELE OBŢINUTE ŞI SEMNIFICAŢIA LOR

În tabela 1 sînt prezentate unele rezultate cu privire la cantitatea sucurilor vacuolar şi plasmatic obţinute din fructele de măr şi din frunzele de varză păstrate la +4°C şi la +28°C, precum şi la cantitatea substanţelor hidrosolubile cuprinse în ele.

Să examinăm întîi rezultatele obţinute în cazul sucului vacuolar ţinînd seama că modificările care se produc, cu timpul, în cantitatea şi compoziţia acestui suc oglindesc modificări survenite în soluţia intracelulară a materialului vegetal pus la păstrat.

Astfel, în timpul păstrării la +4°C, volumul sucului vacuolar rămîne aproape constant atît la fructele de măr, cît şi la frunzele de varză. Cum însă între timp o parte din apa liberă a materialului vegetal se pierde prin evaporare, înseamnă că această pierdere se compensează aproximativ prin apa ce se eliberează lent din biostructură.

La +28°C volumul sucului vacuolar scade. Înseamnă că, la această temperatură relativ ridicată, viteza de evaporare a apei libere din materialul vegetal pus la păstrat este atît de mare, încît depăşeşte viteza cu care biostructura eliberează apa.

În privinţa substanţelor hidrosolubile cuprinse în sucul vacuolar, obţinut atît din fructele de măr, cît şi din frunzele de varză, se constată următoarele : cantitatea lor creşte atunci cînd materialul vegetal este păstrat la +4°C şi scade în cazul păstrării la +28°C. Explicaţia este simplă dacă ţinem seama de faptul că materia vie respiră şi că, datorită acestui fenomen, o parte a substanţelor organice aflate în soluţia intracelulară se pierde prin oxidare. Înseamnă că la +4°C cantitatea de substanţe hidrosolubile ce se eliberează prin destrămarea lentă a biostructurii o depăşeşte pe aceea pierdută prin respiraţie, pe cînd la +28°C procesul de oxidare este atît de intens, încît duce la scăderea substanţelor organice cuprinse în soluţia intracelulară, deşi între timp procesul eliberării lor din biostructură continuă.

Să examinăm acum rezultatele obţinute în cazul sucului plasmatic, ţinînd seama că modificările care se produc cu timpul în cantitatea şi în compoziţia acestui suc depind de starea şi de comportarea biostructurii materialului vegetal pus la păstrat.

Constatarea că atît la mere, cît şi la varză cantitatea sucului plasmatic rămîne practic aceeaşi, este un semn că proporţia apei care se eliberează din biostructură în cursul păstrării este relativ mică, aşa că apa

Tabela 1

Cantitatea (ml) sucurilor vacuolar și plasmatic obținute din cîte 300 g de fructe de măr și frunze de varză păstrate la +4°C și +28°C, precum și cantitatea substanțelor hidrosolubile dizolvate în aceste sucuri, exprimată convențional în g de zaharoză

Material păstrat la		+4°C					+28°C				
Data 1970		23 oct.	2 nov.	12 nov.	23 nov.	3 dec.	23 oct.	2 nov.	12 nov.	23 nov.	3 dec.
Durata (zile)		7	17	27	38	48	7	17	27	38	48
		Suc vacuolar									
Volum (ml)	mere	92	87	100	100	100	90	85	78	60	63
	varză	28	20	25	20	22	35	22	10	–	–
Substanțe dizolvate (g zaharoză)	mere	11,9	12,5	15,2	15,4	15,4	12,3	11,0	11,4	9,1	9,6
	varză	1,1	1,0	1,2	1,4	1,5	0,9	0,7	0,4	–	–
		Suc plasmatic									
Volum (ml)	mere	105	109	100	103	105	126	135	125	130	130
	varză	80	125	105	100	80	142	140	140	–	–
Substanțe dizolvate (g zaharoză)	mere	16,4	16,0	15,6	16,0	16,3	17,2	17,9	19,3	20,6	20,6
	varză	5,8	7,5	8,5	8,3	6,3	10,6	12,7	14,4	–	–

biostructurată, spre deosebire de apa liberă, aproape că nu participă la fenomenul evaporării.

Atrage atenţia faptul că după menţinere timp de 24 de ore la —10°C reziduurile atît ale fructelor de măr, cît mai ales ale frunzelor de varză care au fost păstrate la +28°C dau mai mult suc plasmatic, iar acesta conţine o cantitate sporită de substanţe hidrosolubile în comparaţie cu reziduurile materialului vegetal păstrat la +4°C. Prin urmare, în primul caz, biostructura rămasă în reziduuri, destrămîndu-se lent la —10°C, pune în libertate în decurs de 24 de ore mai multă apă şi cu o cantitate mai mare de substanţe hidrosolubile decît în cazul al doilea. Înseamnă că în cursul păstrării la +28°C biostructura fructelor de mere şi a frunzelor de varză devine tot mai labilă şi mai puţin rezistentă decît în cazul păstrării la temperatura de numai +4°C.

Să trecem acum la examinarea rezultatelor prezentate în tabela 2, care privesc ionii de potasiu şi de calciu cuprinşi în sucul vacuolar şi plasmatic al fructelor de măr şi al frunzelor de varză păstrate la +4°C şi +28°C.

Cantitatea ionilor de potasiu creşte progresiv atît în sucul vacuolar, cît şi în cel plasmatic spre sfîrşitul perioadei de păstrare. Această creştere nu are însă aceeaşi semnificaţie pentru ambele sucuri.

Creşterea cantităţii ionilor de potasiu în sucul vacuolar arată că, pe măsură ce timpul trece, biostructura cedează soluţiei intracelulare o cantitate tot mai mare din aceşti ioni (este de remarcat că, la mere, această cedare este mai intensă la +4°C decît la +28°C, fenomen care urmează să fie lămurit în cazul unor cercetări ulterioare). Prin urmare, în decursul păstrării, biostructura fructelor de măr şi a frunzelor de varză se destramă lent, dar progresiv.

În schimb, creşterea progresivă a cantităţii ionilor de potasiu în sucul plasmatic al fructelor de măr şi al frunzelor de varză păstrate la +28°C este mai mare decît la cele păstrate la +4°C, ceea ce confirmă deducţia făcută mai înainte că în cursul păstrării materialului vegetal starea biologică a biostructurii lui se înrăutăţeşte, biostructura devine tot mai puţin rezistentă şi de aceea eliberează ionii de potasiu în cantitate mereu crescîndă, mai ales în cazul materialului vegetal păstrat la +28°C. Fenomenul acesta permite compararea stării la care ajunge biostructura în diferitele momente ale evoluţiei ei. Aşa, de exemplu, judecînd după cantitatea ionilor de potasiu ce se eliberează, se poate afirma că starea la care ajunge biostructura fructelor de măr după 7, respectiv după 27 de zile de păstrare la +28°C (eliberarea de 214 mg, respectiv 466 mg potasiu) se atinge în cazul păstrării la +4°C abia după 16, respectiv 48 de zile (eliberarea de 229 mg, respectiv 441 mg de potasiu).

Cantitatea ionilor de calciu din sucul vacuolar al fructelor de măr şi al frunzelor de varză aproape că nu se schimbă. Înseamnă că, în condiţiile cercetărilor noastre, biostructura fructelor de măr şi a frunzelor de varză nu elimină ioni de calciu în decursul unei perioade destul de îndelungate de păstrare (deosebire faţă de ionii de potasiu). Numai în cazul fructelor de măr păstrate la +4°C s-a constatat o sporire a cantităţii acestor ioni în sucul vacuolar abia după 38 de zile de la începutul experienţei. Cum destrămarea lentă a biostructurii începe curînd după punerea materialului vegetal la păstrare, înseamnă că trebuie să pro-

Tabela 2

Cantitatea (mg) ionilor de potasiu și de calciu cuprinsă în sucurile vacuolar și plasmatic obținute din cîte 300 g de fructe de măr și frunze de varză păstrate la +4°C și +28°C

Material păstrat la		+4°C					+28°C				
Data 1970		23 oct.	2 nov.	12 nov.	23 nov.	3 dec.	23 oct.	2 nov.	12 nov.	23 nov.	3 dec.
Durata (zile)		7	17	27	38	48	7	17	27	38	48
		Suc vacuolar									
K^+	mere	99	128	176	244	364	110	134	152	183	264
	varză	27	23	29	50	145	26	31	47	—	—
Ca^{++}	mere	21	22	25	38	44	21	21	23	25	28
	varză	10	9	11	11	10	13	11	15	—	—
		Suc plasmatic									
K^+	mere	154	229	249	335	441	214	255	466	600	600
	varză	106	252	638	735	680	402	647	1558	—	—
Ca^{++}	mere	24	30	25	45	46	34	34	32	33	57
	varză	81	79	85	82	85	80	79	123	—	—

greseze destul de mult pînă se ajunge la acel strat al biostructurii în care sînt cuprinşi ionii de calciu.

La sucul plasmatic, situaţia ionilor de calciu este similară : şi aici surplusul acestor ioni apare abia după un timp relativ lung de păstrare a materialului vegetal; surplusul acesta este însă mai puţin pregnant decît la ionii de potasiu, dar îi revine aceeaşi semnificaţie.

CONCLUZII

Biostructura fructelor de măr şi a frunzelor de varză puse la păstrat se destramă lent, punînd în libertate diferite componente aflate în alcătuirea ei.

La o temperatură relativ joasă (+4°C), cantitatea mică de apă ce se eliberează din biostructură compensează cantitatea de apă liberă ce se pierde prin evaporare, iar cantitatea de substanţe hidrosolubile ce se desprind din biostructură depăşeşte cantitatea substanţelor organice ce se pierd prin oxidare (respiraţie).

La o temperatură relativ ridicată (+28°C), evaporarea apei libere şi oxidarea substanţelor organice din materialul vegetal pus la păstrat depăşesc cu mult aportul de apă şi de substanţe hidrosolubile provenite din destrămarea biostructurii.

Eliberarea ionilor de potasiu se face progresiv şi va putea servi eventual la elaborarea unui test pentru caracterizarea stării biostructurii, pe cînd eliberarea ionilor de calciu începe abia spre sfîrşitul perioadei de păstrare şi semnificaţia ei încă nu a fost lămurită.

În fine, s-a constatat că, pe măsură ce timpul trece, biostructura frunzelor de măr şi a frunzelor de varză puse la păstrat devine tot mai labilă, şi aceasta cu atît mai mult cu cît temperatura la care se păstrează materialul vegetal este mai ridicată.

Prezentat la redacţie la 5 aprilie 1971

Institutul de biochimie, Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. E. Macovschi, V. Frunzeti, St. cerc. biochim., **12**, 19 (1969).
2. V. Frunzeti, St. cerc. biochim., **13**, 261 (1970).
3. E. Macovschi, S. Ceauşescu, St. cerc. biochim., **11**, 331 (1968).
4. I. Cornoiu, St. cerc. biochim., **14**, 17 (1971).
5. E. Macovschi, A. Mihăescu, St. cerc. biochim., **11**, 337 (1968).

THE RELEASE OF WATER, HYDROSOLUBLE SUBSTANCES AND POTASSIUM AND CALCIUM IONS FROM THE BIOSTRUCTURE OF APPLE FRUIT AND CABBAGE LEAVES DURING THEIR STORAGE

SUMMARY

The variation of the amount and composition of the vacuolar and plasmatic saps obtained from apples and cabbage leaves during their storage at +4°C and +28°C, was investigated. Based on the results obtained, the evolution of the vegetal material biostructure and its repercurssions on the amount and composition of the intracellular solution was established. The progressive break-down of the biostructure, as followed by the potassium ion amounts set free, may constitute a test for characterizing the state of the biostructured matter, at various moments of fruits and vegetables preservation.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 3, 263–267 (1971)

FORMELE MOLECULARE ALE UNOR ENZIME DIN SEMINȚELE UNEI LINII DE PORUMB ȘI DIN MUTANȚII OBȚINUȚI PRIN IRADIEREA CU NEUTRONI

VICTORIA ALEXANDRESCU, I. SUTKA, IOANA HAGIMA-CĂLIN, DOINA POPOV și F. MIHĂILESCU

Rezumat. — Iradierea cu neutroni a semințelor liniei de porumb WF 9 a dus la obținerea a doi mutanți : pitic (Mu 9) și înalt (Mu 14).
Izoenzimogramele peroxidazei, catalazei, fosfatazei acide și amilazelor din embrionii și endospermii liniei normale și mutanților arată că primele două enzime prezintă forme moleculare diferite cantitativ și calitativ, pe cînd ultimele doar mici diferențe cantitative. Credem că iradierea cu neutroni a adus modificări în echilibrul factorilor de creștere și nu direct asupra centrilor de biosinteză ai enzimelor respective.

Prezența izoenzimelor în organismele vii și rolul lor în metabolismul organismului constituie o problemă actuală atît în urmărirea speciilor, cît și a diferențierilor din cadrul aceleiași specii. Ținînd seama de rezultatele noastre în legătură cu prezența sub diferite forme moleculare, separabile electroforetic, a peroxidazei [1], catalazei [2], fosfatazei acide [3] și amilazelor [4] din porumbul dublu hibrid 336 în primele etape de creștere, am considerat că ar fi interesant din punct de vedere teoretic și util din punct de vedere practic să urmărim dacă și în ce măsură tabloul izoenzimelor se modifică în urma iradierii cu neutroni a semințelor de porumb, cunoscut fiind că această din urmă metodă este folosită curent ca mijloc de obținere a unor mutanți. Rezultatele acestor cercetări aveau deci să ne dea posibilitatea de a aprecia nivelul la care neutronii au acționat asupra metabolismului plantei. S-au folosit semințe de porumb din linia WF 9 și din mutanții Mu 14 (înalt) și Mu 9 (pitic), obținuți prin iradierea cu neutroni a semințelor normale.

MATERIALE ȘI METODE

Descrierea liniei și mutanților analizați. Linia WF 9 a fost obținută la Catedra de selecția plantelor a Universității de științe agrare Gödöllö din Ungaria. Durata perioadei vegetative este de 150 de zile, înălțimea medie a plantei 160—170 cm, înălțimea de fixare a știuleților 70 cm.

Frunzele, în număr de 12—13, sînt destul de late, lăsate în jos, cu o coloraţie antocianică slabă. Tulpina este roşie. Paniculul, de mărime mijlocie, are în general puţine ramuri. Planta dezvoltă un singur ştiulete, de formă cilindrică-conică, de dimensiuni medii. Boabele sînt în formă de dinte, late, plate şi de o culoare galbenă. Greutatea a 1 000 de boabe este de 280—300 g. Cantitatea de seminţe reprezintă 77% din greutatea ştiuletelui. Conţinutul proteinei în seminţe este de 10—11%.

Sublinia de mutaţie Mu 9 este scundă, înălţimea medie 100—110 cm, se coace cu 25 de zile mai devreme şi este foarte rezistentă la cădere. Are puţine frunze, de culoare verde-închis, care spre sfîrşitul perioadei de vegetaţie capătă o culoare roşie antocianică. Paniculul este mic şi stă drept, avînd cîteva ramuri. Numărul de ştiuleţi şi numărul de boabe pe ştiulete întrec pe cel al liniei de bază. Ştiuleţii sînt aplecaţi şi de formă cilindrică. Boabele, în formă de dinte, sînt mărunte. Greutatea a 1 000 boabe este 200 g. Cantitatea de seminţe reprezintă 83% din greutatea ştiuletelui. Conţinutul proteinei în seminţe este de 12—13%.

Sublinia de mutaţie Mu 14 este foarte înaltă, înălţimea medie 200 cm, rezistentă la cădere şi cu puţine frunze, care sînt înguste şi au vîrful căzut. Coloraţia este violetă, bine deosebită de a celorlalte sublinii. Paniculul este scurt, stă drept şi are multe ramuri. Sublinia înfloreşte cu 4—5 zile mai devreme decît linia de bază. Ştiuleţii sînt relativ scurţi şi groşi, conici. Pînă la coacere rămîn atîrnaţi. Boabele sînt mari, groase, scurte, în formă de dinte şi au o culoare galbenă pe care se observă o slabă nuanţă antocianică. Greutatea a 1 000 de boabe este 300 g. Producţia de seminţe reprezintă 76% din greutatea ştiuletelui.

CONDIŢIILE EXPERIMENTALE

S-a lucrat pe embrioni (ax embrionar plus scutel) şi endospermi, separaţi manual după o prealabilă îmbibare cu apă timp de 3—4 ore. După uscare la temperatura camerei, embrionii au fost mojaraţi, iar endospermii măcinaţi. Extracţia proteinelor s-a făcut în NaCl $9^0/_{00}$, iar după dializă extractul s-a liofilizat. Separarea electroforetică şi evidenţierea enzimelor este descrisă în lucrări anterioare pentru peroxidază [1], catalază [2], fosfatază acidă [3] şi amilaze [4].

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din examinarea enzimogramelor peroxidazei în gel de agar (fig. 1 *a*, *b*) reiese că embrionii liniei de mutaţie Mu 9 (pitică) posedă aceleaşi forme moleculare ca şi linia normală, dar intensitatea activităţii lor este diferit repartizată. De remarcat că fracţiunile situate de la start spre anod sînt mai active la linia pitică comparativ cu cea normală.

Linia înaltă conţine în totalitate acelaşi număr de forme moleculare, dar distribuite diferit. Se observă o fracţiune în plus de la start spre anod şi dispariţia unei fracţiuni din grupul cel mai slab electronegativ situat spre catod din cauza curentului de electroendosmoză.

În cazul endospermului constatăm o activitate enzimatică mult mai mare la ambii mutanți, dar formele moleculare care se intensifică sînt diferite ; în plus, linia normală are foarte slab reprezentată fracțiunea cea mai electronegativă și cea mai slab electronegativă.

Kamerbeek [5], determinînd activitatea peroxidazei din frunzele varietăților gigante și pitice de *Tropaeolum majus*, *Nicotiana tabacum*, *Phaseolus crosses* și *Zea mays*, a constatat o activitate mare la plantele pitice față de cele normale și gigant. Evans [6], cercetînd peroxidaza din plantele normale și pitice de tomate, a ajuns la concluzia că activitatea e mai mare la tomata pitică, dar că nu există diferențe calitative. Cercetările noastre arată o reprezentare mai netă a formelor moleculare ale peroxidazei în sensul normal <înalt< pitic alături de unele diferențe calitative, fapt în concordanță cu concluziile lui Verma și Van Huystee [7], care au lucrat pe culturi de cotiledoane de arahide. După Galston și Davies [8], activitatea peroxidazei este dependentă de genotipul plantei. Dacă tipul pitic al plantei este tratat cu giberelină, o dată cu stimularea creșterii se observă scăderea activității peroxidazei și, invers, dacă genotipurile normale sînt oprite din creștere prin aplicarea compușilor care împiedică biosinteza giberelinei, activitatea peroxidazică crește, fapt posibil în cazul nostru la mutantul pitic.

Aplicarea kinetinei sau a etilenei are un efect de stimulare a biosintezei peroxidazei, ceea ce, probabil, se petrece în mutantul înalt.

Aceste date ne arată că tratamentul cu neutroni a acționat profund asupra genotipului din *Zea mays*, schimbînd mecanismul de producere a diferitor hormoni de creștere prezenți în plante.

Din examinarea enzimogramelor catalazei în gel de agar (fig. 2 *a*, *b*) se constată că activitatea acestei enzime este destul de mare în embrionii liniilor cercetate și că embrionii mutantului înalt conțin activitatea cea mai mare. Se constată însă și o diferență în mobilitatea electroforetică între aceste linii de porumb, în sensul că linia normală are fracțiunea catalazică cu mobilitatea cea mai mare, mutantul pitic are fracțiunea cu mobilitatea cea mai mică, iar la mutantul înalt mobilitatea este intermediară între linia normală și pitică.

Activitatea catalazei din endospermi este foarte diferită din punct de vedere cantitativ, în funcție de linia din care este analizată. Astfel, linia normală prezintă activitate catalazică mare, iar varianta pitică o activitate foarte mică, care poate fi decelată pe placa de agar doar la 4 mg de preparat proteic liofilizat, pe cînd pentru celelalte variante s-a lucrat cu 3,5 mg preparat proteic liofilizat și s-a obținut activitatea redată în figură. Și în cazul catalazei din endospermi se observă că din punctul de vedere al mobilității electroforetice există mici diferențe în sensul normal >înalt> pitic. În ansamblu, mobilitatea electroforetică a catalazelor din endospermi este ceva mai mică decît a catalazelor din embrioni. Datele experimentale obținute arată că moleculele catalazei prezentate în liniile analizate nu sînt identice.

Comparînd activitatea catalazei cu cea a peroxidazei, constatăm că activitatea acestor două enzime se compensează reciproc. Embrionii au ambele enzime bine reprezentate. La endospermi acest echilibru se mai găsește doar la linia normală, pe cînd mutanții prezintă o activitate peroxidazică mai mare comparativ cu activitatea catalazică. Verma și

Van Huystee [7], cercetînd aceste două enzime pe o cultură de cotiledoane de arahide (*Arachis hypogaea*), relevă eterogenitatea lor moleculară în diferite mase celulare în funcţie de diametrul celulelor respective. Rezultatele noastre sînt în concordanţă cu aceste constatări atît în ceea ce priveşte mărimea activităţii celor două enzime, cît şi diferenţele calitative evidenţiate de noi electroforetic între liniile luate în studiu.

În figura 3 *a*, *b* sînt redate enzimogramele fosfatazei acide în gel de poliacrilamidă. Se constată o distribuţie asemănătoare a formelor moleculare existente în embrionii, respectiv endospermii liniilor analizate. Astfel embrionii conţin patru forme moleculare evidente; spre anod se mai poate evidenţia o zonă cu activitate fosfatazică slabă, fiind însă dificilă observarea unor fracţiuni în această regiune. Endospermii prezintă trei fracţiuni fosfatazice, cea mai mobilă dintre ele fiind şi cea mai intensă. Jaaska şi Jaaska [9], cercetînd fosfataza acidă din grîuri diploide sălbatice şi cultivate, care din punct de vedere morfologic erau diferite, ajung la concluzia că prezintă forme moleculare identice din punctul de vedere al mobilităţii electroforetice; diferenţe specifice obţin pentru grîurile di- şi tetraploide, dar nu şi pentru cele hexaploide.

În figura 4 *a*, *b*, enzimogramele pe gel de agar în amestec cu amidon pentru activitatea amilazică arată existenţa atît în embrioni, cît şi în endospermi a două forme moleculare majore, situate de la start spre catod; între formele moleculare majore se găseşte şi o fracţiune minoră, iar mai spre catod o zonă de culoare brun-roşcată. Formele moleculare situate de la start spre anod au o activitate foarte slabă. Acestea sînt în număr de trei. De remarcat că formele moleculare cu activitate amilolitică evidenţiate de noi în liniile analizate sînt aceleaşi din punctul de vedere al mobilităţii electroforetice atît în endospermi, cît şi în embrioni; diferenţe cantitative mici pot fi observate la formele moleculare slab reprezentate. Din literatură reiese însă că în cadrul aceleiaşi specii enzimele amilolitice pot prezenta forme moleculare diferite, după cum au arătat Frydenberg şi Nielsen [10], examinînd izoenzimele amilazice din 98 de varietăţi de orz germinat, la care au identificat nouă forme moleculare care se întîlnesc rar pe aceeaşi enzimogramă.

Tratamentul cu neutroni pentru obţinerea mutanţilor analizaţi nu a afectat modul de producere a amilazelor şi fosfatazei acide.

Credem că iradierea cu neutroni a provocat o modificare a echilibrului factorilor de creştere la mutanţii obţinuţi, determinînd astfel şi modificări în ce priveşte necesităţile metabolismului plantelor respective, în timp ce centrii înşişi de biosinteză a enzimelor respective au rămas practic neinfluenţaţi.

CONCLUZII

a) Iradierea cu neutroni a seminţelor liniei de porumb WF 9 a dus la obţinerea a doi mutanţi: Mu 9, cu înălţimea medie 100 cm, şi Mu 14, cu înălţimea medie 200 cm.

b) S-a constatat că la aceste linii formele moleculare ale peroxidazei şi catalazei se deosebesc atît prin intensitatea activităţii lor, cît şi prin mobilitatea electroforetică.

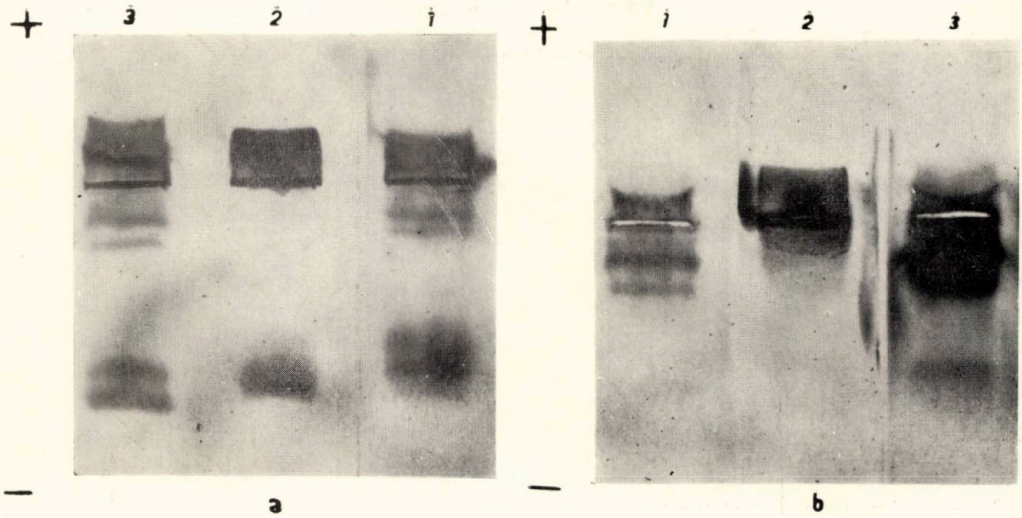


Fig. 1. — Enzimogramele peroxidazei din embrionii (*a*) şi din endospermii (*b*) seminţelor liniei de porumb WF 9 (*1*) şi a mutanţilor obţinuţi prin iradierea cu neutroni a seminţelor normale: Mu 9-pitic (*2*) şi Mu 14-înalt (*3*).

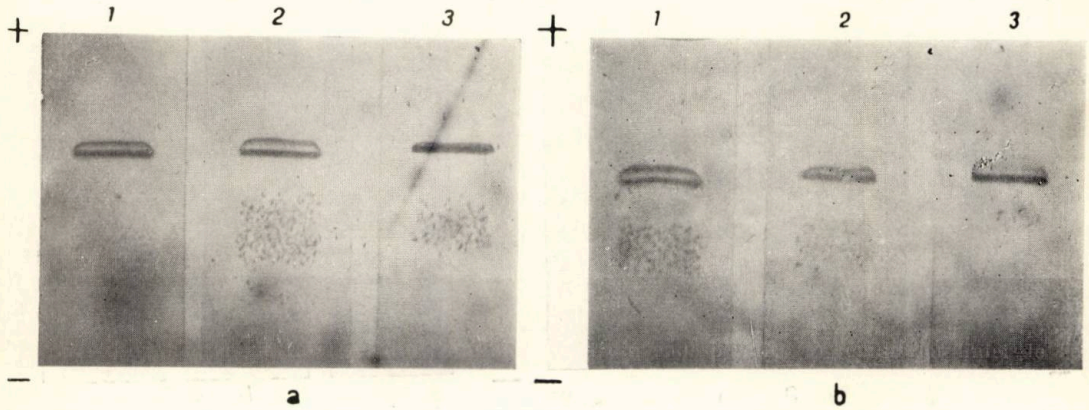


Fig. 2. — Enzimogramele catalazei din embrionii (*a*) şi din endospermii (*b*) seminţelor liniei de porumb WF 9 (*1*) şi a mutanţilor obţinuţi prin **iradierea cu neutroni** a seminţelor normale: Mu 9-pitic (*2*) şi Mu 14-înalt (*3*).

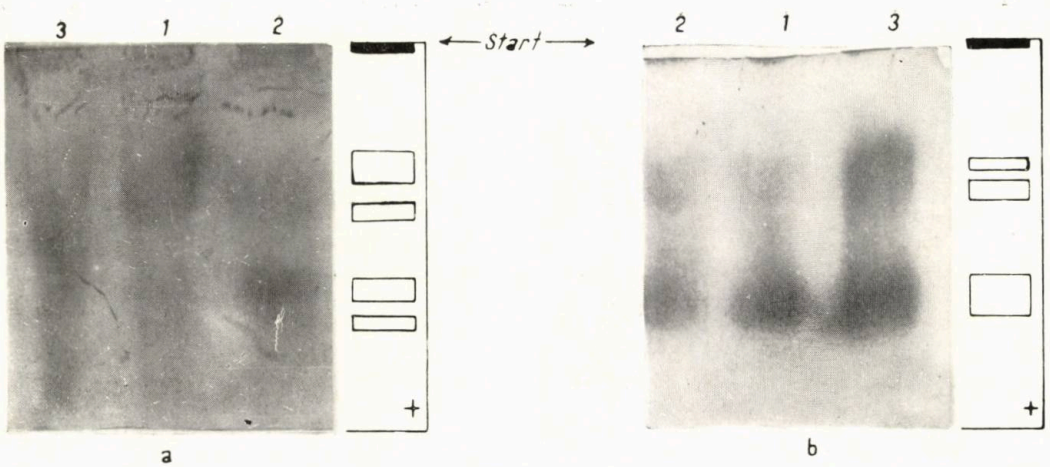


Fig. 3. — Enzimogramele fosfatazei acide din embrionii (*a*) şi din endospermii (*b*) seminţelor liniei de porumb WF 9 (*1*) şi a mutanţilor obţinuţi prin iradierea cu neutroni a seminţelor normale: Mu 9 (*2*) şi Mu 14-înalt (*3*).

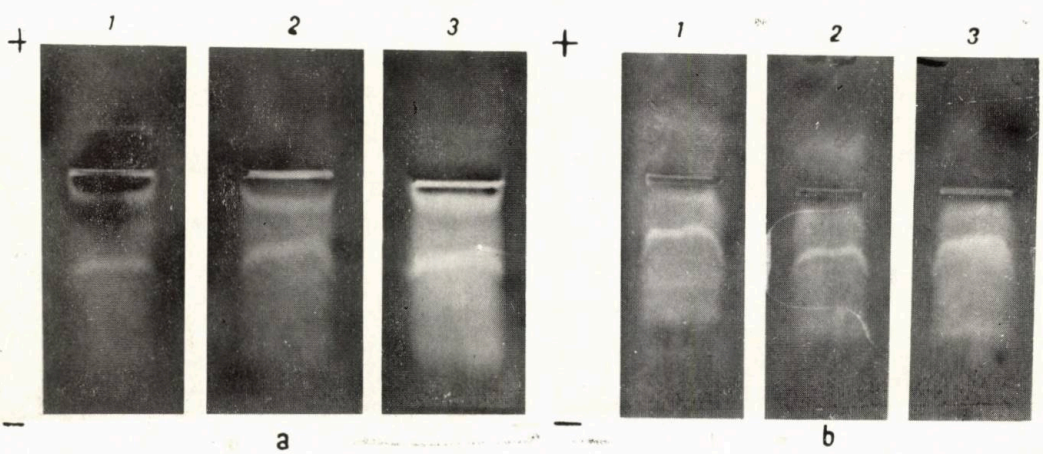


Fig. 4. — Enzimogramele amilazelor din embrionii (*a*) şi din endospermii (*b*) seminţelor liniei de porumb WF 9 (*1*) şi a mutanţilor obţinuţi prin iradierea cu neutroni a seminţelor normale: Mu 9 (*2*) şi Mu 14-înalt (*3*).

c) La aceste linii, fosfataza acidă şi enzimele amilolitice sînt asemănătoare din punctul de vedere al mobilităţii electroforetice; pot fi observate diferenţe mici cantitative.

d) Credem că iradierea cu neutroni a adus modificări în echilibrul factorilor de creştere şi nu a acţionat direct asupra centrilor de biosinteză a enzimelor respective.

Prezentat la redacţie la 3 aprilie 1971

Institutul de biochimie, Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. I. Hagima-Călin, St. cerc. biochim., **13**, 47 (1970).
2. V. Alexandrescu, St. cerc. biochim., **13**, 233 (1970).
3. D. Popov, St. cerc. biochim., **12**, 377 (1969).
4. V. Alexandrescu, F. Mihăilescu, St. cerc. biochim., **12**, 315 (1969).
5. G. A. Kamerbeek, Acta Botan. Neerl., **5**, 257 (1956).
6. J. J. Evans, N. A. Alldridge, Phytochemistry, **4**, 449 (1965).
7. D. P. S. Verma, R. B. Van Huystee, Can. J. Biochem., **48**, 444 (1970).
8. A. W. Galston, P. J. Davies, Science, **163**, *3873*, 1288 (1969).
9. V. Jaaska, V. Jaaska, Eesti NSV Ta Toimet Biol., **19**, 344 (1970).
10. O. Frydenberg, G. Nielsen, Hereditas, **54**, 123 (1965).

THE MOLECULAR FORMS OF SOME ENZYMES FROM THE SEEDS OF ONE MAIZE INBRED AND THE MUTANTS OBTAINED BY NEUTRONS IRRADIATION

SUMMARY

Neutron irradiation of the maize inbred seeds (WF 9) led to two mutants: dwarf (Mu 9) and tall (Mu 14).

The analysis of the enzymograms of peroxidase, catalase, acid phosphatase and amylases from the normal inbred embryos and endosperm compared with those of the mutants shows that the first two enzymes present qualitatively and quantitatively different molecular forms while the last two evince only slight quantitative differences.

We believe that neutron irradiation modified the equilibrium of growing factors and did not act directly on the biosynthetic sites of the enzymes under study.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 3, 269–274 (1971)

ELIBERAREA APEI, A SUBSTANȚELOR HIDROSOLUBILE, A IONILOR DE POTASIU ȘI CALCIU ȘI A RIBONUCLEAZEI DIN BIOSTRUCTURA FRUNZELOR DE PORUMB SUB ACȚIUNEA CLORAMFENICOLULUI ȘI ARSENITULUI DE SODIU

VIORICA ELEFTERESCU

Rezumat. — S-a urmărit acțiunea cloramfenicolului și arsenitului de sodiu asupra biostructurii frunzelor de porumb prin eliberarea de apă, substanțe hidrosolubile, ioni de potasiu și calciu și RN-ază. S-a constatat că arsenitul are o acțiune înaintată de destrămare asupra biostructurii, pe cînd cloramfenicolul prezintă o acțiune mai restrînsă. Faptele constatate s-au pus în legătură cu necesitatea prezenței unei anumite cantități de energie pentru menținerea integrității biostructurii.

Cloramfenicolul exercită asupra țesuturilor vegetale acțiuni asemănătoare cu cele ale inhibitorilor metabolici, deși în unele privințe el se deosebește de aceștia. Astfel, ca și dinitrofenolul (DNP), el inhibă acumularea de ioni de către feliile de morcov [1] și de sfeclă roșie [2], în schimb nu intensifică activitatea ATP-azei și inhibă hidroliza ATP [3]. Deși cloramfenicolul nu este considerat un decuplant al fosforilării oxidative, totuși Hanson și Hodges [2] admit că inhibarea acumulării de ioni de către țesuturile vegetale s-ar datora acestei acțiuni.

În ceea ce privește arsenitul de sodiu ($AsNaO_2$), cu acțiune netă de decuplant, și el prezintă unele deosebiri față de DNP, și anume, printre altele, previne acumularea de azidă de sodiu (N_3Na) în mitocondrii și stimulează respirația țesuturilor vegetale [4].

Dat fiind că lucrările noastre anterioare au arătat că în prezența DNP și azidei de sodiu, cunoscuți decuplanți ai fosforilării oxidative, biostructura frunzelor de porumb se destramă parțial, eliberînd o parte din apa și din componentele din care este alcătuită [5], [6], era interesant de stabilit modul în care biostructura țesutului foliar se comportă în prezența cloramfenicolului și arsenitului de sodiu.

Dacă destrămarea biostructurii provocată de DNP și azida de sodiu ar depinde numai de decuplarea fosforilării oxidative, ar trebui ca în prezența cloramfenicolului, compus cu proprietăți incerte de decuplant, fenomenul de destrămare a biostructurii să nu aibă loc, iar în prezența arsenitului de sodiu decuplant cunoscut acest fenomen să se producă exact ca în cazul DNP și al azidei de sodiu.

Prin urmare, ar fi de aşteptat ca cloramfenicolul introdus în ţesutul foliar să nu producă eliberarea apei şi a substanţelor hidrosolubile din biostructură, iar arsenitul de sodiu să producă aceste efecte.

Pentru a urmări acţiunea acestor compuşi asupra biostructurii am tratat frunze de porumb cu soluţiile respective.

MATERIAL ŞI METODE

Am lucrat cu frunze ale plantulelor de porumb, hibridul (HS-301) în vîrstă de 12—14 zile, crescute în condiţii de lumină artificială (fluorescentă); frunzele se tăiau de la colet, se legau în mănunchiuri de cîte 50 g şi se introduceau cu capetele în soluţii apoase de cloramfenicol 0,1 %, respectiv arsenit de sodiu 1 %. Frunzele plantulelor-martor tăiate asemănător erau introduse în apă. După 24 de ore, partea introdusă în soluţie se spăla cu apă distilată şi se usca prin tamponare cu hîrtie de filtru, apoi frunzele se storceau într-o presă hidraulică de laborator tip Hafico, model II, prevăzută cu dispozitivul special pentru cantităţi mici de material. Presiunea se ridica treptat pînă la 150 atm şi se menţinea pînă cînd materialul înceta să mai cedeze suc (15 min erau în general de ajuns). Cantitatea de suc S_1 (vacuolar) obţinută se măsura cu cilindrul gradat şi se exprima în ml. După centrifugare la 5 000 rot/min timp de 10 min, se determina concentraţia globală a sucului cu refractometrul Abbe, model Karl Zeiss Jena, şi se exprima convenţional în g de zaharoză la 100 ml de suc, după tabelul lui Wagner [7]. Apoi sucul se dilua 1/10 cu apă bidistilată şi se determina concentraţia ionilor de potasiu şi calciu la fotometrul cu flacără model III Karl Zeiss Jena; în sucul diluat 1/1 se doza ribonucleaza [8]. Reziduurile rămase în presă după obţinerea sucului S_1 (vacuolar) erau îngheţate la —12°C timp de 24 de ore şi, după dezgheţare, supuse din nou presării în condiţiile descrise mai sus. Sucul S_2 (plasmatic) obţinut se analiza în mod similar cu cel vacuolar. Datele obţinute au fost supuse calculului statistic după metoda perechilor [9], [10].

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din examinarea datelor obţinute (tabela 1) se constată că atît frunzele tratate cu arsenit de sodiu, cît şi cele tratate cu cloramfenicol (Clf) cedează prin stoarcere o cantitate de suc vacuolar mai mare decît frunzele plantelor-martor, tratate cu apă.

În ceea ce priveşte substanţele hidrosolubile, sucul vacuolar obţinut din frunzele tratate cu arsenit (Ars) conţine o cantitate de substanţe hidrosolubile mai mare, distinct semnificativă faţă de martor şi de Clf.

Tot în tabela 1 sînt prezentate unele rezultate obţinute prin dozarea cationilor de potasiu şi calciu în sucurile obţinute din frunzele proaspete de porumb tratate cu apă, respectiv cu arsenit de sodiu şi cloramfenicol. Dacă analizăm cantităţile acestor ioni eliberaţi în sucul vacuolar, constatăm că K^+ se eliberează în cantitate apreciabil mai mare decît Ca^{++}. Ca

Tabela 1

Cantitatea (ml), conținutul în substanțe hidrosolubile exprimate în g de zaharoză (Z), precum și conținutul ionilor de potasiu și de calciu (mg) ale sucurilor vacuolare obținute prin stoarcerea la 150 atm a frunzelor proaspete de porumb tratate (24 de ore, 20–22°C) cu apă (M-martor), cu cloramfenicol (Clf) 0,1% și arsenit de sodiu (Ars) 1%, cît și ale sucurilor plasmatice obținute prin stoarcerea reziduurilor înghețate (–12°, 24 de ore). Datele reprezintă medii a cîte cinci loturi de plante. Rezultatele semnificative sînt încadrate

	ml			Z g/suc total			K^+ mg/suc total			Ca^{++} mg/suc total		
	M	Clf	Ars	M	Clf	Ars	M	Clf	Ars	M	Clf	Ars
				Suc vacuolar (S_1)								
Valori minime	5	10	13	0,1	0,13	0,31	4,5	7	16	2,0	2,2	3,1
Valori maxime	11,0	16	16	0,2	0,28	0,49	14	25	31	9,0	13,0	14
Media valorilor	8,5	12	15	0,15	0,19	0,38	10	12,6	21	4,9	6,0	7,8
Diferența față de martor	—	3,8	6,5	—	0,04	0,24	—	2,5	11,7	—	1,9	2,8
DL		2,62 / 0,05	2,5 / 0,01	—	0,05 / 0,05	0,12 / 0,01	—	7,36 / 0,05	6,67 / 0,01	—	3,05 / 0,05	2,8 / 0,05
				Suc plasmatic (S_2)								
Valori minime	6	7	1	0,10	0,28	0,03	13,5	14,7	1,25	2,6	4,3	0,44
Valori maxime	11	11	6	0,40	0,41	0,24	18,0	17,0	5,70	9,0	6,8	3,40
Media valorilor	8,5	9,1	3	0,25	0,29	0,1	15,28	15,9	6,36	4,8	5,0	1,6
Diferența față de martor	—	0,7	5,5	—	0,04	0,15	—	0,64	8,76	—	0,35	3,17
DL	—	2,38 / 0,05	4,63 / 0,01	—	0,15 / 0,05	0,14 / 0,05	—	2,58 / 0,05	5,89 / 0,05	—	2,11 / 0,05	6,10 / 0,05

şi în cazul substanţelor hidrosolubile, tratamentul cu Ars produce o eliberare de K^+ şi Ca^{++} mai puternică decît cel cu Clf, ceea ce denotă că Ars provoacă o destrămare înaintată a biostructurii, pe cînd Clf nu exercită această acţiune. Clf acţionează totuşi asupra biostructurii, provocînd numai eliberare de apă.

O altă componentă urmărită a fost ribonucleaza, a cărei prezenţă în sucul vacuolar de porumb a fost semnalată de noi într-o lucrare anterioară [8]. În tabela 2 sînt înscrise rezultatele obţinute prin dozarea activităţii ribonucleazice a sucurilor vacuolare obţinute din frunzele de porumb tratate cu apă (martor) sau cu soluţii de Ars, respectiv de Clf.

Tabela 2

Cantitatea de RN-ază, exprimată în unităţi de RN-ază pe suc total, în sucurile vacuolare obţinute prin stoarcerea la 150 atm a frunzelor proaspete de porumb tratate (24 de ore, 20–27°C) cu apă (M-martor), cu cloramfenicol (Clf) 0,1% şi arsenit de sodiu (Ars) 1%, cît şi sucurile plasmatice obţinute prin stoarcerea reziduurilor îngheţate (–12°, 24 ore). Datele reprezintă media a cîte patru loturi de plante. Rezultatele semnificative sînt încadrate

	Suc vacuolar			Suc plasmatic		
	RN/suc total			RN/suc total		
	M	Clf	Ars	M	Clf	Ars
Valori minime	100	228	227	244	224	36
Valori maxime	400	462	467	354	407	85
Media valorilor	267	343	336	302	331	67
Diferenţa faţă de martor	—	75	66,5	—	34	235
		59,4	64,27		18,91	140,7
DL	—	0,01	0,05	—	0,05	0,01

Se constată că atît Clf, cît şi Ars produc o eliberare de ribonucleză, Clf chiar în cantitate mai mare. Din datele obţinute reiese că Ars, ca şi DNP şi N_3Na, provoacă destrămarea înaintată a biostructurii, eliberînd apa, substanţe hidrosolubile, ioni de K şi de Ca şi ribonucleză, pe cînd Clf are o acţiune mult mai restrînsă asupra biostructurii : în prezenţa acestui compus, biostructura eliberează numai apă şi ribonucleză.

Dat fiind că Clf produce asupra biostructurii frunzelor de porumb o acţiune restrînsă, ar fi de aşteptat ca biostructura rămasă în reziduurile frunzelor tratate cu Clf să se comporte la temperatură joasă la fel ca biostructura frunzelor-martor, tratate numai cu apă, adică să elibereze aceleaşi componente şi în aceleaşi proporţii ca şi aceasta din urmă. În schimb, biostructura rămasă în reziduul frunzelor tratate cu Ars ar trebui ca în aceleaşi condiţii, adică la aceeaşi temperatură joasă, să prezinte o altă comportare, şi anume să elibereze prin destrămare diferite componente în cantitate mai mică decît biostructura frunzelor-martor, respectiv

a frunzelor tratate cu Clf, deoarece, sub influența Ars, biostructura frunzelor proaspete a eliberat deja cantități sporite ale acestor componente.

Într-adevăr, dacă urmărim rezultatele obținute pe sucul plasmatic, constatăm că volumul sucului obținut de la frunzele-martor și de la cele tratate cu Clf prezintă valori asemănătoare între ele și mai mari decît cele obținute de la frunzele tratate cu Ars. Același fenomen se întîmplă cu substanțele hidrosolubile, cu ionii de potasiu și calciu, precum și cu RN-aza, cantitățile acestor componente în sucurile plasmatice ale frunzelor-martor și ale celor tratate cu Clf depășind cu mult pe cele din sucul frunzelor tratate cu Ars.

Astfel, biostructura rămasă de la frunzele-martor și de la cele tratate cu Clf se destramă la înghețare în decurs de 24 de ore la fel, punînd în libertate aproximativ aceeași cantitate de apă, substanțe hidrosolubile, ioni de potasiu, calciu și RN-ază, pe cînd biostructura rămasă după tratamentul cu Ars eliberează prin înghețare în decurs de 24 de ore cantități mult mai mici ale acelorași componente.

CONCLUZII

1. Rezultatele obținute demonstrează că Ars exercită asupra biostructurii un efect de destrămare cu mult mai intens decît cel constatat în cazul Clf.

2. Corelînd această constatare cu faptul cunoscut că Ars este un decuplant al fosforilării oxidative, pe cînd Clf nu, reiese că stabilitatea biostructurii este funcție de fosforilarea oxidativă, deci de prezența compușilor macroergici în mediu și că decuplarea acestui proces produce destrămarea parțială a biostructurii.

Prezentat la redacție la 3 aprilie 1971

Institutul de biochimie, București

BIBLIOGRAFIE

1. R. N. Robertson, M. J. Wilkins, D.C. Weeks, Austral. J. Sci. Res., **4**, 248 (1951).
2. J. B. Hanson, T. K. Hodges, Nature, **200**, 1009 (1963).
3. C. D. Stoner, T. K. Hodges, J. B. Hanson, Nature, **203**, 258 (1964).
4. R. A. Zoyagilskaya, K. Bogucka, L. Wojtezak, Acta Bioch. Pol., **16**, 163 (1969).
5. E. Macovschi, V. Frunzeti, St. cerc. biochim., **12**, 19 (1969).
6. V. Elefterescu, St. cerc. biochim., **13**, 261 (1970).
7. B. Wagner, *Tabellen zum Eintauchrefraktometer Sonderhausen*, 1907, p. VIII, 46.
8. E. Macovschi, V. Frunzeti-Elefterescu, St. cerc. biochim., **12**, 115 (1969).
9. M. Steinbach, *Prelucrarea statistică în medicină și biologie*, Edit. Academiei, 1961, p. 321.
10. H. Sluşanschi, St. cerc. biochim., **8**, 345 (1965).

THE RELEASE OF WATER, WATERSOLUBLE COMPOUNDS, POTASSIUM AND CALCIUM IONS AND OF RIBONUCLEASE FROM THE BIOSTRUCTURE OF MAIZE LEAVES, BY THE ACTION OF CLORAMPHENICOL AND SODIUM ARSENITE

SUMMARY

The action of cloramphenicol and sodium arsenite upon the biostructure of maize leaves was followed by estimating the release of water, water soluble compounds, potassium and calcium ions and of ribonuclease. It was found that sodium arsenite has a strong action of breakage of biostructure, while cloramphenicol has a less strong action. These findings were connected to the necessity of a certain amount of energy for maintaining the biostructure integrity.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 3, 275–283 (1971)

MODIFICAREA CONȚINUTULUI ÎN AUXINE AL PLANTELOR DE *ZERNA INERMIS* (LEYS) LINDM. PROVENITE DIN SEMINȚE IRADIATE CU RAZE GAMMA ALE ^{60}Co

ILEANA HURGHIȘIU și AURELIA BREZEANU

Rezumat. — S-a determinat conținutul în auxine al plantelor de *Zerna inermis* (Leys) Lindm. provenite din semințe iradiate cu raze gamma ale ^{60}Co în doze de 5 000, 10 000 și 15 000 r. Determinările s-au efectuat în cursul perioadei de vegetație a plantelor, prelevîndu-se probe la 30 și 90 de zile de la semănare, iar la plantele-martor și în anul al doilea de vegetație. S-a constatat că conținutul în auxine scade prin creșterea dozei de iradiere a plantelor. Am găsit însă o cantitate mai mare de auxine la nivelul nodului de înfrățire la 30 de zile de la semănare sub forma unei fracțiuni neidentificate, fracțiunea X, și la 90 de zile sub forma acidului 3-indolil-butiric. Numărul fracțiunilor inhibitoare în testul Avena predomină. Prin cromatografia pe hîrtie s-au separat un număr diferit de fracțiuni, care variază de la un organ la altul și de la o fază de vegetație la alta a plantelor. Frecvent s-au întîlnit acizii 3-indolil-propionic și 3-indolil-butiric; în cazuri particulare s-au găsit acizii 3-indolil-acetic și 3-indolil-acetic plus triptofan și o fracțiune X, neidentificată. Rezultă că există o corelație între acumularea derivaților indolici la nivelul nodului de înfrățire și procesul de organogeneză.

Se cunoaște faptul că plantele provenite din semințe iradiate prezintă unele dereglări metabolice la nivelul substanțelor de creștere. Milan Masey, Oplistelova și Bulgakov [1], Sideris, Kleinhofs și Nilan [2] și Skoog [3], [4] au urmărit influența diferitelor doze de iradiere asupra conținutului în substanțe de creștere și au constatat că acesta scade prin creșterea dozei. Dacă se administrează plantelor zinc, conținutul în substanțe de creștere este refăcut în parte. Ruhland [5], Vasilev [6], Vasilev, Maslova și Parfenova [7] și Vasilev, Parfenova și Rîbalka [8] au lucrat cu plante de grîu iradiat cu radiații ionizante și au constatat unele dereglări metabolice. Se cunoaște că puterea de germinare și vitalitatea plantelor scad ca urmare a iradierii. Cercetări în acest sens au făcut Bowen [9], Osborne și Bacon [10], Hamidi, Saheh și Hamidi [11] și alții. Într-o lucrare anterioară [12], analizînd conținutul în aminoacizi liberi la plantele de *Zerna inermis* (Leys) Lindm. provenite din semințe iradiate cu raze gamma ale ^{60}Co, am găsit că prin creșterea dozei de iradiere sinteza aminoacizilor liberi se intensifică.

Nodul de înfrățire la graminee reprezintă organul care produce înmulțirea abundentă prin fenomenul de înfrățire. Audus [13], Netsch,

Pratt și Shaulis [14], Pilet [15] și Mer [16] dau unele indicații asupra modului de acțiune al substanțelor de creștere în procesul de ramificare a axelor tulpinale la graminee.

Dacă acest fenomen morfologic de înfrățire abundentă este corelat cu factorii endogeni, respectiv cu acumularea substanțelor de creștere în această zonă, influența iradierii seminței asupra localizării diferitelor substanțe de creștere la nivelul anumitor organe ale plantei, cum ar fi nodul de înfrățire la graminee și evoluția localizării în cursul perioadei de vegetație a plantelor, nu s-au urmărit încă.

Ne-am propus să urmărim localizarea diferitelor substanțe de creștere la nivelul anumitor organe, ocupîndu-ne în special de nodul de înfrățire la o specie de graminee spontană cu înfrățire abundentă, *Zerna inermis* (Leys) Lindm., examinînd în decursul perioadei lor de vegetație plantele provenite din semințe iradiate cu raze gamma ale ^{60}Co.

În această lucrare prezentăm date legate de raportul dintre organogeneză, formarea mugurilor de înfrățire și localizarea auxinelor în sistemul tulpinal în funcție de perioada de vegetație.

MATERIAL ȘI METODĂ

S-a lucrat cu cîte 1 g de semințe în trei variante de iradiere a acestora, și anume 5 000, 10 000 și 15 000 r, iradierea efectuîndu-se cu raze gamma provenite de la o sursă de ^{60}Co.

Plantele provenite din semințele iradiate s-au crescut pe sol brun-roșcat de pădure, cu nisip de rîu în proporție de 2/1, în seră, în condiții optime de umiditate și de temperatură (temperatura cuprinsă între 17 și 24°C și umiditatea solului 60% din capacitatea sa pentru apă).

Determinările s-au efectuat în două momente ale perioadei de vegetație a plantelor, și anume la 30 și la 90 de zile de la semănare. La plantele-martor, determinările s-au efectuat și în anul al doilea de vegetație.

Determinările s-au făcut pe organe, în probe medii provenite de la 100 de plante în cazul determinărilor cantitative prin metoda colorimetrică și de la numai 30 de plante în cazul determinărilor cantitative prin metoda testului biologic, deoarece acesta e mult mai sensibil la cantități mici de auxine. S-au analizat următoarele organe : frunze, nod de înfrățire, rădăcini, tulpini, rizomi și inflorescență.

Extracția auxinelor din aceste organe s-a făcut cu eter etilic purificat (fără peroxizi), prin metoda indicată de Benet-Clark și Kefford [17].

Conținutul de auxine s-a determinat în extractul eteric brut, concentrat. S-a efectuat testul biologic Avena după metoda indicată de Audus [13] și prin cromatografie pe hîrtie [17].

În cazul testului biologic pentru care s-au folosit cariopse decorticate de ovăz Cenad 88, s-au preparat două concentrații din extractul brut, anume 1 : 10 și 1 : 100.

În cazul cromatografiei pe hîrtie, după evaporarea extractului brut, reziduul s-a reluat cu o soluție de amoniac 0,5 N, din care s-au aplicat spoturi pe hîrtia cromatografică MN 261. Irigarea s-a făcut cu

alcool izopropilic-amoniac-apă (16 : 1 : 3). Compușii separați s-au eluat apoi în două concentrații, 1 : 10 și 1 : 100, în care s-a determinat conținutul în compuși indolici.

În cazul determinărilor cantitative prin testul biologic, rezultatele sînt date în spor de creștere al coleoptilelor de ovăz, exprimat în mm, măsurătorile efectuîndu-se la binocular.

De asemenea s-au făcut și evaluări cantitative prin metoda eluției petelor obținute pe cromatograme și determinarea colorimetrică a conținutului în substanțe de creștere după metoda lui Gordon și Weber [18], folosind ca eluant o soluție de clorură ferică-acid percloric. Rezultatele sînt exprimate în μg de substanță de creștere la 100 g de țesut vegetal proaspăt.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatele testului biologic și acelea ale determinărilor cantitative sînt prezentate în tabelele 1—4.

În figurile 1—3 sînt prezentate cromatogramele obținute în două faze de vegetație a plantelor (30 și 90 de zile de la semănare) și la plantele-martor în anul al doilea de vegetație.

Un prim efect al iradierii semințelor s-a manifestat prin scăderea numărului plantelor răsărite din 1 g de semințe semănate, pe măsură ce doza de iradiere a acestora din urmă a crescut. Astfel, la dozele de 5 000, 10 000 și 15 000 r se observă o scădere de 20, 30 și, respectiv, 40 % față de semințele neiradiate ale martorului.

Determinările cantitative prin metoda colorimetrică (tabela 1) reprezintă valorile medii a patru determinări pe cîte 100 de plante (4 g de semințe). Se observă că în prima fază de vegetație (30 de zile de la semănare) s-au separat cromatografic trei fracțiuni, dintre care în cantitate mai mare acidul 3-indolil-butiric; acesta scade însă prin creșterea dozei de iradiere. Fracțiunea neidentificată X este crescută la nodul de înfrățire la doze mici de iradiere și scade prin creșterea dozei acestora. La 90 de zile de la semănare s-au identificat numai două fracțiuni. Cantitatea mai mare s-a înregistrat de asemenea în cazul acidului 3-indolil-butiric, la dozele mici de iradiere.

În cazul eluțiilor de pe cromatograme (tabela 2), determinările reprezintă valorile medii a patru determinări pe cîte 30 de plante (1 g de semințe). La 30 de zile de la semănare s-au identificat prin testul Avena atît fracțiuni inhibitoare, cît și stimulatoare; cantitatea auxinelor e mai scăzută prin creșterea dozei de iradiere. S-au separat cromatografic acizii 3-indolil-propionic și 3-indolil-butiric, precum și o fracțiune neidentificată X.

La 90 de zile de la semănare, în cazul eluțiilor de pe cromatograme (tabela 3) se înregistrează, în majoritate, fracțiuni inhibitoare, deci cantitate crescută de auxine. Conținutul în auxine se menține oarecum constant în cazul celor trei doze de iradiere. Cromatografic s-au identificat acizii 3-indolil-propionic și 3-indolil-butiric.

În cazul determinărilor efectuate în anul al doilea de vegetație (tabela 4) la plantele-martor, se constată în majoritate prezența fracțiu-

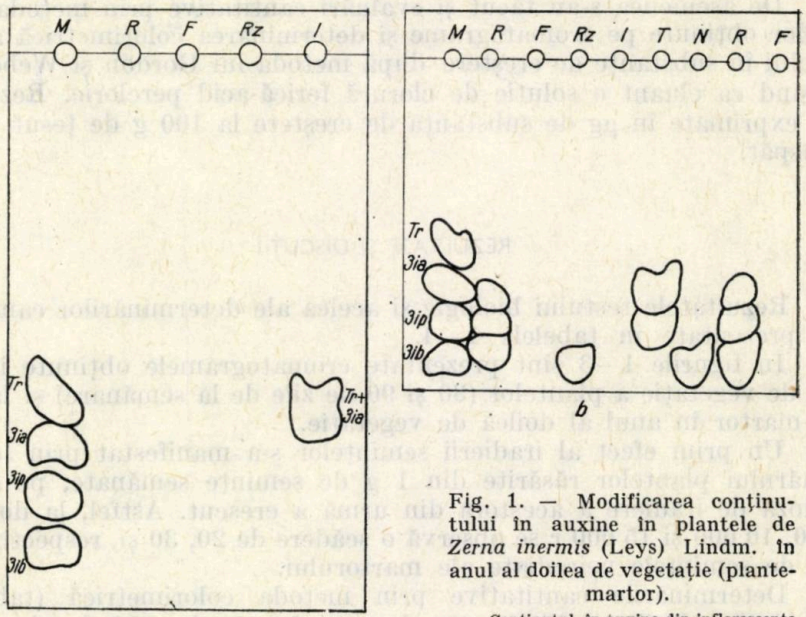


Fig. 1. — Modificarea conținutului în auxine în plantele de *Zerna inermis* (Leys) Lindm. în anul al doilea de vegetație (plante-martor).

a — Conținutul în auxine din inflorescența plantelor; *b* — conținutul în auxine din rădăcini, rizomi, tulpini și nod.

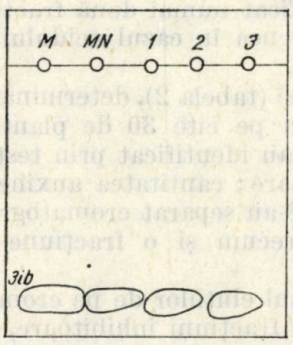


Fig. 2. — Modificarea conținutului în auxine din plante de *Zerna inermis* (Leys) Lindm. ca urmare a iradierii cu raze gamma ale ^{60}Co (30 de zile de la semănare).

— Conținutul auxinelor din nodul de înfrățire.

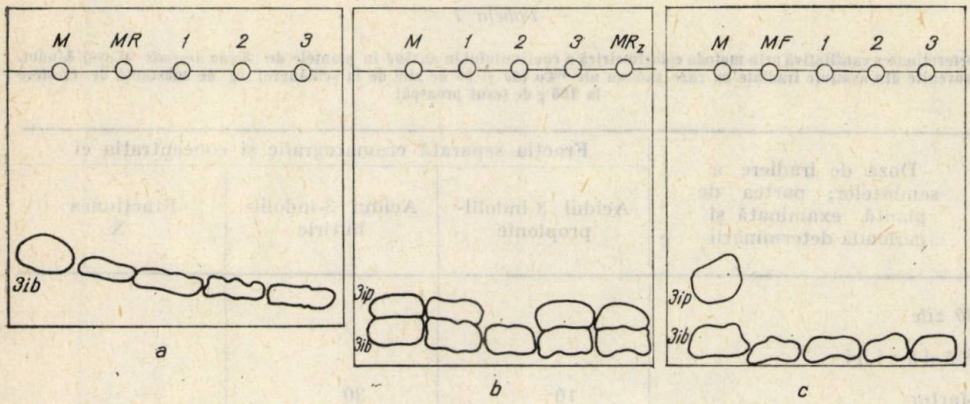


Fig. 3. — Modificarea conținutului în auxine din plantele de *Zerna inermis* (Leys) Lindm. ca urmare a iradierii plantelor (90 de zile de la semănare).

a — Conținutul în auxine din rădăcini; *b* — conținutul în auxine din rizomi; *c* — conținutul în auxine din frunze. M — martori substanțe de creștere, R — rădăcini, F — frunze, Rz — rizomi, I — inflorescență, T — tulpini, N — nod, MN — martor nod, MR — martor rădăcini, MRz — martor rizomi, MF — martori frunze, *1, 2, 3* — doze de iradiere a plantelor, respectiv 5 000, 10 000 și 15 000 r; Tr — triptofan, 3 ia — acidul 3-indolil-acetic, 3 ip — acidul 3-indolil-propionic, 3ib — acidul 3-indolil-butiric, Tr + 3 ia — triptofan + acidul 3-indolil-acetic.

nilor stimulatoare, deci cantitate mică de auxine. Cromatografic s-au înregistrat un număr mai mare de fracțiuni, și anume acizii 3-indolil-acetic, 3-indolil-propionic, 3-indolil-butiric și 3-indolil-acetic plus triptofan. Tabelele 3 și 4 reprezintă valorile medii a patru determinări pe cîte 30 de plante (1 g de semințe).

Din cele prezentate rezultă că cercetările noastre confirmă cercetările efectuate de Milan, Masey, Oplistelova și Bulgakov [1], Sideris, Kleinhofs și Nilan [2], Skoog [3], [4], Ruhland [5], Vasilev [6], Vasilev, Maslova și Parfenova [7], Vasilev, Parfenova și Rîbalka [8], Bowen [9], Osborne și Bacon [10] și Hamidi, Saheh și Hamidi [11], prin faptul că am constatat, în general, o scădere a conținutului în auxine a numărului de plante răsărite pe măsură ce doza de iradiere a crescut.

Aducem date noi prin faptul că am găsit o cantitate mai mare de auxine localizată la nivelul mugurilor de înfrățire în fazele tinere ale plantei (30 de zile de la semănare), sub forma unei fracțiuni neidentificate, fracțiunea X, și o acumulare și transformare a conținutului în substanțe de creștere în cursul perioadei de vegetație, astfel că în momentul înfrățirii (90 de zile de la semănare) am identificat în cantitate mare acidul 3-indolil-butiric. Rezultă că numărul și componența fracțiunilor separate cromatografic variază cu organul analizat și faza de dezvoltare a plantei.

Prin faptul că am găsit o acumulare a compușilor indolici la nivelul mugurilor de înfrățire în prima fază și al nodului de înfrățire în a doua fază, se evidențiază o legătură între procesul de organogeneză și acumularea derivaților indolici.

Tabela 1

Determinarea cantitativă prin metoda colorimetrică a conținutului în auxine în plantele de *Zerna inermis* (Leys) Lindm. provenite din semințe iradiate cu raze gamma ale ^{60}Co (30 și 90 de zile de la semănare) μg de substanță de creștere la 100 g de țesut proaspăt

Doza de iradiere a semințelor, partea de plantă examinată și perioada determinării	Fracția separată cromatografic și concentrația ei		
	Acidul 3-indolil-propionic	Acidul 3-indolil-butiric	Fracțiunea X
30 zile			
Rădăcini			
Martor	10	30	—
5 000 r	—	15	—
10 000 r	—	20	—
15 000 r	—	10	—
Frunze			
Martor	—	40	—
5 000 r	—	17	—
10 000 r	—	12	—
15 000 r	—	43	—
Nod (muguri de înfrățire)			
Martor	—	—	28
5 000 r	—	—	35
10 000 r	—	—	10
15 000 r	—	—	18
90 zile			
Rădăcini			
Martor	—	6	—
5 000 r	—	3	—
10 000 r	—	15	—
15 000 r	—	30	—
Frunze			
Martor	—	63	—
5 000 r	—	35	—
10 000 r	—	67	—
15 000 r	—	18	—
Nod de înfrățire			
Martor	—	26	—
5 000 r	—	62	—
10 000 r	—	26	—
15 000 r	—	68	—
Rizomi			
Martor	20	33	—
5 000 r	4	6	—
10 000 r	—	40	—
15 000 r	16	25	—

Tabela 2

Modificarea conținutului în auxine din plante de *Zerna inermis* (Leys) Lindm. provenite din semințe iradiate cu raze gamma ale ^{60}Co (30 de zile de la semănare). Testul Avena: spor de creștere al coleoptilelor de ovăz, exprimat în mm (măsurători efectuate la binocular)

Doza de iradiere a semințelor și partea de plantă examinată	Fracțiunea separată cromatografic și concentrația ei					
	acidul 3-indolil-propionic		acidul 3-indolil-butiric		fracțiunea X	
	1 : 10	1 : 100	1 : 10	1 : 100	1 : 10	1 : 100
Rădăcini						
Martor	—	+3,0	+0,5	+8,6	—	—
5 000	—	—	−0,7	+6,3	—	—
10 000	—	—	−2,1	+6,1	—	—
15 000	—	—	−0,3	−0,3	—	—
Frunze						
Martor	—	—	+1,7	+5,0	—	—
5 000	—	—	−1,4	+6,3	—	—
10 000	—	—	0	+9,0	—	—
15 000	—	—	−1,6	+5,1	—	—
Nod (muguri de înfrățire)						
Martor	—	—	—	—	−0,5	+3,5
5 000	—	—	—	—	+0,4	+4,8
10 000	—	—	—	—	−0,8	+4,5
15 000	—	—	—	—	+0,8	+7,0

Tabela 3

Modificarea conținutului în auxine în plantele de *Zerna inermis* (Leys) Lindm. provenite din semințe iradiate cu raze gamma ale ^{60}Co (90 de zile de la semănare). Testul Avena: spor de creștere al coleoptilelor de ovăz, exprimat în mm (măsurători efectuate la binocular)

Doza de iradiere a semințelor și partea de plantă examinată	Fracțiunea separată cromatografic și concentrația ei			
	acidul 3-indolil-propionic		acidul 3-indolil-butiric	
	1 : 10	1 : 100	1 :10	1 :100
Rădăcini				
Martor	—	—	−0,6	−0,5
5 000 r	—	—	−5,8	+0,9
10 000 r	—	—	−5,1	−4,3
15 000 r	—	—	−8,6	−6,6
Frunze				
Martor	—	—	−2,0	+1,8
5 000 r	—	—	−5,0	+2,1
10 000 r	—	—	−5,3	+1,8
15 000 r	—	—	−6,7	−0,6
Nod de înfrățire				
Martor	—	—	−5,2	+5,2
5 000 r	—	—	−9,1	−0,9
10 000 r	—	—	−7,2	−0,5
15 000 r	—	—	−9,5	−1,8
Rizomi				
Martor	−6,4	−4,2	−5,1	+2,0
5 000 r	−6,8	+2,9	−3,3	+0,8
10 000 r	—	—	−4,5	−0,2
15 000 r	−7,9	−0,6	−2,5	−3,0

Tabela 4

Modificarea conținutului în auxine în plante de *Zerna inermis* (Leys) Lindm. provenite din semințe iradiate cu raze gamma ale ^{60}Co(anul al doilea de vegetație). Testul Avena: spor de creștere al coleoptilelor de ovăz, exprimat în mm (măsurători efectuate la binocular)

Partea de plantă examinată	Fracțiunea separată cromatografic și concentrația ei							
	acidul 3-indolil-propionic		acidul 3-indolil-butiric		acidul 3-indolil-acetic		triptofan + acidul 3-indolil-acetic	
	1 : 10	1 : 100	1 : 10	1 : 100	1 : 10	1 : 100	1 : 10	1 : 100
Rădăcini	−0,2	−0,5	−1,6	+0,4	−1,4	−0,9	—	—
Rizomi	—	—	−1,8	−0,2	—	—	—	—
Nod de înfrățire	—	—	−0,2	−1,7	—	—	—	—
Tulpini	−2,2	−1,2	—	—	- 2,6	−0,3	—	—
Inflorescență	—	—	—	—	—	—	−2,7	−2,2

CONCLUZII

Plantele provenite din semințe iradiate cu raze gamma ale ^{60}Co prezintă unele dereglări metabolice la nivelul substanțelor de creștere, exprimate prin modificări de la o fază de vegetație la alta, de la o doză de iradiere la alta și de la un organ la altul.

În general, prin creșterea dozei de iradiere conținutul în auxine scade. S-a găsit însă o cantitate mai mare de auxine la nodul de înfrățire în fazele tinere de dezvoltare, unde am separat cromatografic fracțiunea neidentificată X și în faze mai avansate de dezvoltare, cînd s-a separat acidul 3-indolil-butiric. Numărul fracțiunilor separate cromatografic variază cu organul analizat și cu faza de dezvoltare a plantei. Astfel în stadii tinere s-au separat trei fracțiuni, în fază mai avansată două fracțiuni, iar numărul cel mai mare de fracțiuni, patru, la plantele-martor, în anul al doilea de vegetație.

Procesul de ramificare a axelor tulpinale are loc în strînsă corelare cu acumularea derivaților indolici la nivelul nodului de înfrățire.

Prezentat la redacție la 18 februarie 1971

Secția de ultrastructura și citogenetică,
Institutul de biologie „Tr. Săvulescu", București

BIBLIOGRAFIE

1. K. Milan, N. Masey, K. Oplistelova, R. Bulgakov, Biol. Plant., **8**, 152 (1966).
2. E. I. Sideris, S. A. Kleinhofs, R. A. Nilan, Rad. Bot., **9**, 349 (1969).
3. F. Skoog, Science, **79**, 256 (1934).
4. F. Skoog, Jour. Cell. and Comp. Physiol., **7**, 227 (1935).
5. W. Ruhland, Encyclopedia of Plant Physiology, Springer-Verlag, Berlin—Gottingen—Heidelberg, **14**, 450 (1961).
6. I. M. Vasilev, *Deistvie ioniziruiușcih izlucenii na rastenia*, Izdatelstvo Akad. Nauk SSSR, Moscova, 1962, p. 35.

7. I. M. Vasilev, E. I. Maslova, O. I. Parfenova, Dokladî Academii Nauk SSSR, **130**, 928 (1960).
8. I. M. Vasilev, O. I. Parfenova, N. D. Ribalka, Dokladî Acad. Nauk SSSR. **124**, 928 (1959).
9. J. M. Bowen, Rad. Bot., **1**, 223 (1962).
10. T. S. Osborne, J. A. Bacon, Rad. Res., **13**, 686 (1960).
11. A. Hamidi, M. Saheh, H. Hamidi, Abhandl. Deut. Akad. Wiss., **3**, 563 (1966).
12. I. Hurghișiu, A. Brezeanu, H. Titu, Revué Roumanie de Biologie, Série Botanique, **16**, 2 (1971).
13. L. J. Audus, *Plant Growth Substances*, Interscience Publishers, Inc. University Press Aberdeen, New York, 1963.
14. J. P. Netsch, C. Pratt, C. Netsch, N. R. Shaulis, Amer. J. Bot., **47**, 566 (1960).
15. P. E. Pilet, *Les phytohormones de croissance*, Masson, Paris, 1961.
16. C. L. Mer, New Phytol., **68**, 266 (1969).
17. F. A. Benet-Clark, N. P. Kefford, Nature, **171**, 645 (1953).
18. S. A. Gordon, R. P. Weber, Plant Physiol., **26**, 192 (1951).

MODIFICATION IN AUXINE CONTENT OF *ZERNA INERMIS* (LEYS) LINDM. PLANTS ORIGINATING IN ^{60}Co GAMMA RAY IRRADIATED SEEDS

SUMMARY

The auxine content was determined in plants of *Zerna inermis* (Leys) Lindm. originating in seeds irradiated with ^{60}Co gamma rays, in doses of 5 000, 10 000 and 15 000 r.

Determinations were carried out in the course of plant vegetation period; samples were collected in the 30 and 90 days after sowing; from control plants samples were taken in the second year of vegetation, too.

The increase in the irradiation dose of seeds induces the decrease in auxine content. An accumulation of auxine content in the tillering buds was found after 30 days from the sowing, as an unknown X fraction; after 90 days, this fraction occurs as 3-indolil-butiric acid. The number of inhibition fractions in the Avena test is prevailing. A different number of fractions varying with the organ and the vegetation period of plants could be separated by paper chromatography. 3-Indolil-propionic and 3-indolil-butiric acids, were frequently found; sometimes 3-indolil-acetic acid, 3-indolil-acetic acid plus triptophan, and a non-identified X fraction were also found.

A correlation seems to exist between the accumulation of growth substances within tillering buds and the organogenesis.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 3, 285–288 (1971)

ELECTROFOREZA ÎN GEL DE POLIACRILAMIDĂ A PROTEINELOR SERICE PROVENITE DE LA ŞOBOLANI MASCULI CU SINDROM LITIAZIC RENAL INDUS PRIN ETILENGLICOL

O. MACARIE, D. TĂNĂSESCU şi NATALIA MOLDOVEANU

Rezumat. — Pentru studiul modificărilor calitative ale proteinelor serice provenite de la şobolani masculi cu litiază oxalică indusă cu etilenglicol şi trataţi concomitent cu etanol şi citrat a fost folosită electroforeza în poliacrilamidă, verticală, în strat subţire. Au fost separate 17 fracţiuni proteice. Modificări semnificative ale migrării electroforetice au putut fi observate la proteinele serice provenite de la şobolanii trataţi cu etilenglicol, în timp ce la variantele cu citrat şi etanol aceste perturbări nu mai sînt sesizabile.

S-a constatat de mai mult timp că la diferite mamifere, inclusiv la om, după ingestia de etilenglicol se produce cu destulă regularitate litiaza renală oxalică. Din punct de vedere histopatologic, leziunile renale observate la şobolanul mascul cu litiază oxalică indusă cu etilenglicol sînt superpozabile celor din intoxicaţia acută a omului cu această substanţă şi au unele puncte comune cu cele remarcate în litiaza spontană umană [1]. Din aceste motive, provocarea experimentală a litiazei oxalice constituie o posibilitate de studiu atît a acţiunii favorizante sau preventiv curative a unor substanţe asupra litiazei spontane sau induse cu etilenglicol, cît şi pentru aflarea tratamentului adecvat în cazul intoxicaţiilor acute cu acest dialcool.

În cadrul studiului modificărilor biochimice care apar în organism în prezenţa şi în timpul tratamentului litiazei renale provocate, prezentăm în această notă rezultatele obţinute cu privire la modificările calitative ale proteinelor serice ale şobolanilor trataţi cu etilenglicol.

MATERIAL ŞI METODĂ

Litiaza renală a fost indusă la şobolani masculi, rasa Wistar, prin administrarea de etilenglicol 1% în apa de băut, conform indicaţiilor date de Debray [1]. În alte variante experimentale, şobolanii au fost trataţi şi cu etanol + citrat, pentru a determina efectul protector al acestor substanţe faţă de intoxicaţia produsă de etilenglicol. Notăm

că dozele de citrat şi de alcool administrate au fost mai reduse decît acelea administrate de alţi cercetători [2], [3], [4]. S-a lucrat pe 12 loturi de cîte 8 animale. Modul de tratare al loturilor este prezentat în tabela 1.

Tabela 1

Hrana şi tratamentul aplicat loturilor de animale

Lot nr.	Hrană uscată pulbere		Apă	Etanol		Etilenglicol
	normală	cu adaos de citrat		2%	4%	1%
1	+	−	+	−	−	−
2	+	−	−	+	−	−
3	+	−	−	−	+	−
4	+	−	−	−	−	+
5	+	−	−	+	−	+
6	+	−	−	−	+	+
7	−	+	+	−	−	−
8	−	+	−	+	−	−
9	−	+	−	−	+	−
10	−	+	−	−	−	+
11	−	+	−	+	−	+
12	−	+	−	−	+	+

1 000 g hrană uscată pulbere normală a constat din 500 g pesmet, 50 g lapte praf, 50 g morcov deshidratat, 334 g făină de ovăz, 66 g făină de porumb. 1 000 g hrană uscată cu adaos de citrat a fost compusă din 900 g hrană uscată pulbere normală, 25 g acid citric, 37,5 g citrat monopotasic cu două molecule de apă şi 37,5 g citrat monosodic cu o moleculă de apă. Consumul de etilenglicol în 21 zile/şobolan a fost de 4,8 — 6,5.

După 3 săptămîni, animalele au fost sacrificate prin deschiderea aortei abdominale.

Pentru separarea electroforetică a proteinelor serice am aplicat tehnica electroforezei în strat subţire, descrisă de Ahroyd [5], cu modificările aduse de Tănăsescu şi Moldoveanu [6]. Am folosit ca mediu de migrare un gel de o concentraţie de 5% acrilamidă în tampon TRIS-EDTA-borat, la pH = 7,15 [6].

În fiecare dispozitiv de migrare au fost introduse cîte şase probe a 0,05 ml ser nehemolizat, provenite de la şase animale diferite. Migrarea a fost efectuată la 4°C, 350 V (25 mA), timp de 2 ore şi 30 min.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Fracţiunile proteice separate au fost identificate orientîndu-ne după schema dată de Clark [7] şi păstrînd denumirea convenţională a fracţiunilor electroforetice, şi anume albumine şi globulinele α_1, α_2, β şi γ. După cum reiese din fotografia electroforegramei serului provenit de la şobolanii-martori (lot 1), orientîndu-ne în sensul migrării distingem urmă-

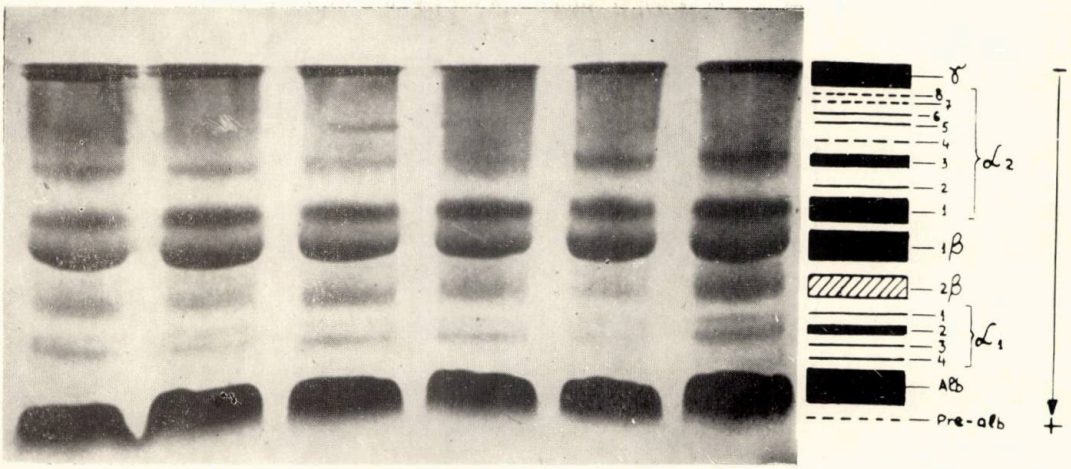


Fig. 1. — Electroforeza comparativă a şase probe de ser provenite de la şobolani netrataţi. Electroforeza a fost efectuată în gel de acrilamidă 5%, în tampon TRIS-EDTA-borat, pH = 7,15.

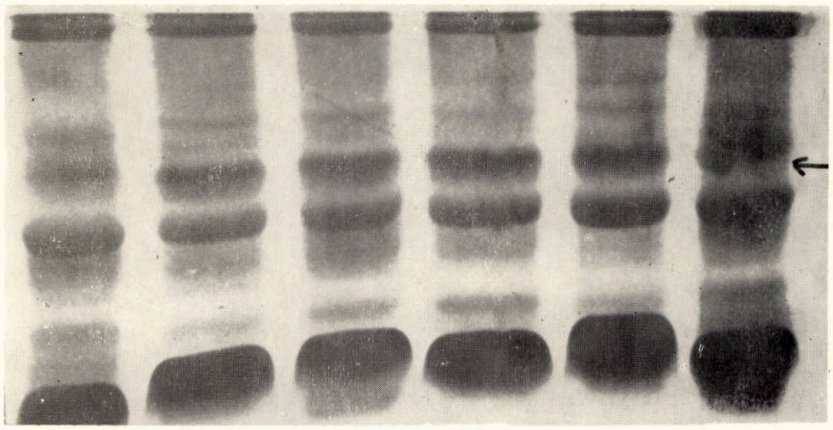


Fig. 2. — Electroforeza a şase seruri provenite de la şobolani trataţi cu etilenglicol 1%, în condiţiile descrise în text şi în figura 1.

toarele fracţiuni : o fracţiune γ_1-globulinică ; un număr de opt fracţiuni corespunzătoare fracţiunii α_2-globulinice clasice ; două fracţiuni β-globulinice ; patru fracţiuni corespunzătoare fracţiunii α_1-globulinice clasice ; o fracţiune albuminică şi una prealbuminică (fig. 1).

Dintre acestea distingem un număr de şase fracţiuni principale, şi anume o fracţiune α_1-globulinică, două fracţiuni α_2, una β_1, una β_2 şi, în sfîrşit, o fracţiune corespunzătoare albuminei.

Reiese că, în condiţiile noastre, proteinele serice de şobolani sînt separate prin electroforeza în poliacrilamidă într-un număr de 17 fracţiuni proteice.

În ceea ce priveşte variantele cercetate, cele mai evidente modificări calitative ale fracţiunilor proteice faţă de lotul-martor le-am observat la animalele tratate cu etilenglicol (lot 4). Se remarcă astfel (fig. 2) o creştere a fracţiunii corespunzătoare γ_1-globulinei, a grupului de proteine care reprezintă fracţiunea clasică α_1-globulinică şi a prealbuminei. De asemenea se constată apariţia unei fracţiuni în zona α_2-globulinei, indicată cu o săgeată în figura 2, pe care nu o mai întîlnim în celelalte variante.

Imaginea electroforetică a proteinelor serice provenite de la celelalte loturi de animale nu a prezentat modificări sesizabile în raport cu lotul-martor.

Modificările cantitative şi chiar calitative observate la nivelul globulinelor ne permit să presupunem că etilenglicolul sau produşii săi de degradare, fie împreună, fie separat, ar afecta procesele de sinteză ale proteinelor plasmatice de la nivelul ficatului sau al sistemului reticulohistocitar. Apariţia unei fracţiuni în zona α_2-globulinei pare a întări această presupunere.

Aceste procese, fiind complexe şi avînd loc la nivele foarte intime, ar putea explica lipsa dovezilor histopatologice. Totuşi, modificările de volum ale ficatului, menţionate în literatura de specialitate şi observate şi de noi, ne permit să presupunem că acest organ este afectat în cursul litiazei induse de etilenglicol. Nu trebuie exclusă şi posibilitatea ca unele din modificările constatate de noi la nivelul fracţiunilor globulinice să fie datorate şi perturbărilor funcţionale care au loc prin lezarea rinichiului.

CONCLUZII

Modificarea imaginii electroforetice este semnificativă numai la proteinele serice provenite de la şobolanii trataţi cu etilenglicol singur. Este probabil că administrarea concomitentă a etilenglicolului cu etanolul şi cu citratul să nu mai permită inducerea unor modificări calitative ale diferitelor fracţiuni proteice care să fie sesizabile în condiţiile noastre de lucru.

Spitalul militar central
şi
Institutul de biochimie,
Bucureşti

Prezentat la redacţie la 2 martie 1971

BIBLIOGRAFIE

1. CH. DEBRAY, CH. VAILLE, ET. MARTIN, M. SOUCHARD, CL. ROZE, Semain Hôp. (Paris), **39**, 101 (1963).
2. CH. DEBRAY, CH. VAILLE, ET. MARTIN, M. SOUCHARD, CL. ROZE, Presse, Med., **73**, 1559 (1965).
3. CH. DEBRAY, CH. VAILLE, ET. MARTIN, M. SOUCHART, CL. ROZE, Semain Hôp., **49**, 3001 (1968).
4. CH. VAILLE, CH. DEBRAY, M. SOUCHARD, CL. ROZE, Ann. Pharm. France, **26**, 593 (1968).
5. L. P. AHROYD, Analytical Biochem., **19**, 399 (1967).
6. D. TĂNĂSESCU, N. MOLDOVEANU, St. cerc. biochim., **11**, 313 (1968).
7. J. T. CLARKE, Annals. N. Y. Acad. Sci., **121**, 428 (1964).

POLYACRILAMIDE GEL ELECTROPHORESIS OF SERUM PROTEINS ORIGINATING IN MALE RATS WITH ETHYLENEGLYCOL-INDUCED RENAL LITHIASIS SYNDROME

ABSTRACT

In order to study the qualitative changes in serum proteins of male rats with oxalic lithiasis induced by ethylene glycol and concomitantly treated with ethanol and citrate, we used the vertical, thin layer, polyacrylamide electrophoresis. Seventeen proteic fractions have been separated in our working conditions. Significant changes in the electrophoretic migration have been noticed in serum proteins resulted from rats treated with ethylene glycol, while for citrate and ethanol variants, such perturbations are no longer discernible.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 3, 289–294 (1971)

IONII DE POTASIU ŞI SODIU ÎN ŢESUTUL MUSCULAR STRIAT DE IEPURE

OLGUŢA MACOVSCHI

Rezumat. — Interpretarea, din punctul de vedere al teoriei biostructurii, a cercetărilor comparative efectuate pe sucurile stoarse din ţesutul muscular striat, viu şi omorît în diferite moduri, a condus la concluzia că biostructura ţesutului muscular striat conţine mult mai mult potasiu decît sodiu. La destrămarea sa o dată cu moartea, cantitatea ionilor eliberaţi depinde atît de natura factorului ce produce moartea, cît şi de durata acţiunii acestui factor asupra ţesutului.

Conform teoriei biostructurii [1], distribuţia asimetrică a electroliţilor între celule şi lichidul interstiţial se datoreşte integrării inegale a electroliţilor în biostructură. Astfel, biostructura conţine majoritatea potasiului tisular şi o oarecare cantitate de sodiu, în timp ce în apa liberă tisulară, alcătuită din apa lichidului interstiţial şi apa soluţiei intracelulare, se găsesc dizolvaţi restul potasiului şi majoritatea sodiului, cu excepţia unor cantităţi mici de potasiu şi sodiu adsorbite la nivelul materiei biostructurate şi al coloizilor tisulari. Dispariţia acestei asimetrii la moartea celulei reprezintă o consecinţă a destrămării biostructurii, cînd apa şi ionii integraţi în biostructură se eliberează şi se adaugă la apa şi ionii care au fost iniţial liberi în ţesut [1].

O metodă pentru cercetarea repartiţiei diverselor substanţe hidrosolubile între materia biostructurată şi apa liberă din ţesuturi constă în analiza comparativă a sucurilor ce se obţin prin comprimarea materialului biologic în diferite condiţii experimentale [1] — [3]. Într-adevăr, s-a constatat că prin stoarcerea materialului viu, la presiuni hidrostatice ce nu produc moartea şi deci destrămarea biostructurii, se obţine un suc, numit convenţional „suc vacuolar" pentru ţesuturile vegetale şi „suc interstiţial" pentru ţesuturile animale, alcătuit din apa liberă a ţesuturilor şi substanţele dizolvate în ea; prin omorîrea şi apoi prin stoarcerea reziduului rămas după îndepărtarea din materialul biologic viu a sucului vacuolar, respectiv interstiţial, se obţine un suc, numit „plasmatic", alcătuit din apă şi substanţe hidrosolubile provenite din destrămarea biostructurii; prin stoarcerea materialului biologic omorît se obţine un suc „mixt", alcătuit atît din apa liberă tisulară şi substanţele dizolvate în ea, cît şi din apa şi din substanţele hidrosolubile eliberate din biostructură [1] — [3].

Rezultatele obţinute prin aplicarea acestei metode în cercetarea distribuţiei ionilor de potasiu, calciu şi sodiu între biostructura ţesutu-

rilor vegetale şi apa liberă au permis dezlegarea unor aspecte ale problemei permeabilităţii celulare [4].

Dat fiind că pe ţesuturi animale astfel de cercetări încă nu s-au făcut, ne-am propus ca, folosind aceeaşi metodă, să investigăm distribuţia ionilor între biostructură şi apa liberă tisulară la ţesutul muscular striat.

Aveam de urmărit atît raportul dintre ionii de potasiu, respectiv de sodiu, integraţi în biostructură şi cei existenţi în apa liberă tisulară, cît şi relaţiile care există între natura şi intensitatea de acţiune a factorilor ce determină destrămarea biostructurii şi cantitatea ionilor eliberaţi din aceasta. Cercetarea prezintă interes şi datorită faptului că, în conformitate cu datele obţinute anterior, ţesutul muscular striat se comportă asemănător cu ţesuturile vegetale în ceea ce priveşte distribuţia apei şi a substanţelor hidrosolubile între biostructură şi apa liberă tisulară [3].

MATERIALE ŞI METODE

Am folosit probe de cîte 45—50 g de muşchi striaţi albi din coapsă de iepure, prelevaţi imediat după omorîrea animalului prin exsanghinare; am lucrat atît pe muşchi vii, cît şi pe muşchi omoriţi prin păstrare* la temperaturi diferite, prin congelare cu zăpadă carbonică şi prin expunere la vapori de formaldehidă.

Pentru obţinerea sucurilor interstiţial şi mixt, probele de muşchi uii, respectiv omoriţi, se storceau timp de 30 min la 150 atm cu ajutorul vnei prese hidraulice manuale tip Hafico. Pentru obţinerea sucului plasmatic, reziduul rămas după îndepărtarea sucului interstiţial era omorît printr-unul din modurile amintite şi apoi stors din nou timp de 30 min la 150 atm. După măsurarea volumului sucului şi precipitarea proteinelor se dozau ionii de potasiu şi sodiu. În acest scop, la 1 ml suc se adăuga 1 ml acid tricloracetic 6%, precipitatul format se filtra prin hîrtie de filtru cu porii mari şi se spăla, iar filtratul, adus la 20 ml cu apă distilată, se analiza la fotometrul cu flacără.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Pentru stabilirea raportului dintre ionii de potasiu, respectiv de sodiu, integraţi în biostructură şi cei existenţi în apa liberă tisulară, am cercetat comparativ cantităţile acestor ioni în sucurile interstiţial, mixt şi plasmatic.

În tabela 1 sînt prezentate unele date privind cantităţile de ioni din sucurile interstiţiale şi mixte, raportate la 1 g (greutate umedă) de ţesut muscular striat.

Se observă că, indiferent de modul în care a fost omorît ţesutul, sucul mixt conţine o cantitate mult mai mare de potasiu şi sodiu decît sucul interstiţial. Rezultă, aşadar, că o dată cu moartea, la ionii existenţi iniţial în stare solvită în apa liberă a ţesutului, se adaugă o nouă cantitate de ioni, care provin din destrămarea biostructurii.

* În cazul omorîrii prin păstrare la temperaturi diferite, pentru a împiedica pierderile de apă din ţesut, muşchii au fost introduşi în cutii de polistiren bine închise, al căror volum depăşea cu puţin voumul a 45—50 mg de muşchi.

În cazul potasiului, sucul mixt conţine o cantitate de ioni de 1,5 —4,1 ori mai mare decît sucul interstiţial; se observă deci că majoritatea potasiului din ţesutul muscular striat este integrată în biostructură şi numai o parte este dizolvată în apa liberă din ţesut.

Tabela 1

Cantitatea ionilor de potasiu şi sodiu din sucurile interstiţial şi mixt în μM/g ţesut muscular striat (greutate umedă) viu şi omorît prin păstrare la +4°C şi —10°C, congelare cu zăpadă carbonică şi expunere la vapori de formaldehidă. Sucurile au fost obţinute prin stoarcerea unor probe de 45—50 g ţesut muscular striat alb de iepure la 150 atm timp de 30 min.

	Muşchi viu	Păstrare 24 ore la +4°C	Păstrare 24 ore la —10°C	Congelare cu zăpadă carbonică	Expunere la vapori de formaldehidă 24 ore
	suc interst.	suc mixt			
K (μM/g)		33,78 54,25 33,80 23,92	83,00 62,70 70,96 53,84	97,63 101,00 70,50 103,80 66,00	95,00 94,65 97,70
Val. medie	23,00*	36,43	68,10	87,70	95,80
K mixt / K interst.		1,5	2,9	3,8	4,1
Na (μM/g)		9,37 16,06 9,13 6,76	14,23 17,70 13,50 13,39 12,80 15,50	16,02 15,86 17,53 20,30 13,48 12,34	15,27 15,33 17,50
Val. medie	7,8*	9,83	14,53	16,23	16,00
Na mixt / Na interst.		1,2	1,8	2,0	2,0

* Valorile medii pentru cantitatea ionilor de potasiu şi sodiu din sucul interstiţial reprezintă media a 25 de determinări.

În sucul mixt, cantităţile de ioni de sodiu sînt aproximativ de 1,2 — 2 ori mai mari decît în sucul interstiţial. Cu alte cuvinte, în biostructura muşchiului striat de iepure se găseşte o cantitate de sodiu aproximativ egală cu cea din apa liberă tisulară.

Aceste constatări concordă cu cele la care se ajunge dacă se compară cantităţile de ioni de potasiu şi sodiu din sucul interstiţial şi plasmatic (tabela 2). Se observă că, după îndepărtarea sucului interstiţial şi omorîrea materialului rămas, în sucul plasmatic ce se obţine prin comprimarea acestui material la 150 atm timp de 30 min apar noi cantităţi de apă şi ioni de potasiu şi sodiu, proveniţi din destrămarea biostructurii. Raportul dintre cantitatea de ioni de potasiu din sucul plasmatic şi cea din sucul interstiţial variază între 1 şi 3 ori, în timp ce pentru ionii de sodiu raportul respectiv este cuprins între numai 0,8 şi 1,6.

În același timp, comparînd raporturile în care potasiul și sodiul se găsesc în apa liberă și în biostructură, se observă că aceasta din urmă conține o cantitate mai mare de potasiu decît de sodiu.

Concluzii asemănătoare au fost obținute pentru țesuturile vegetale studiate în condiții similare [4].

Tabela 2

Cantitatea ionilor de potasiu și sodiu în sucurile interstițial și plasmatic în μM/g țesut muscular striat (greutate umedă). După îndepărtarea sucului interstițial, țesutul a fost omorît prin păstrare la +4°C și la −16°C, congelare cu zăpadă carbonică și expunere la vapori de formaldehidă. Sucurile au fost obținute prin stoarcerea unor probe de 45–50 g țesut muscular striat alb de iepure la 150 atm timp de 30 min.

	Mușchi viu	Păstrare 24 ore la +4°C	Păstrare 24 ore la −10°C	Congelare cu zăpadă carbonică	Expunere la vapori de formaldehidă 24 ore
	Suc. interst.	Suc plasmatic			
K (μM/g)		24,30 21,10 26,44	42,30 43,10 45,50 43,20	53,20 68,90 65,00 58,58	56,37 75,20 67,20 64,40
Val. medie	23,00*	23,60	43,50	61,48	65,79
K plasmatic / K interstițial		1,0	1,9	2,7	2,9
Na (μM/g)		6,30 5,80 6,57	12,03 9,30 8,90	9,10 11,40 9,63 12,20	13,76 11,40 12,46 13,15
Val. medie	7,8*	6,22	10,07	10,58	12,69
Na plasmatic / Na interstițial		0,8	1,3	1,4	1,6

* Valorile medii pentru cantitatea ionilor de potasiu și sodiu din sucul interstițial reprezintă media a 25 de determinări.

Pentru a rezolva cea de-a doua problemă propusă, și anume modul în care natura și intensitatea acțiunii factorilor ce determină destrămarea biostructurii influențează cantitățile de ioni eliberate din aceasta, am urmărit, pe de o parte, cantitățile de ioni din sucurile mixte și plasmatice obținute de la probe de mușchi omorîte în diferite moduri, iar pe de alta cantitățile de ioni din sucurile mixte obținute de la probe omorîte în același mod, dar expuse pentru diferite perioade de timp acțiunii factorului care determină moartea țesutului. Rezultatele sînt prezentate în tabelele 1–3.

Din tabela 1 se observă că în sucul mixt se găsesc cantități diferite de ioni atunci cînd mușchii sînt omorîți în moduri diferite. Astfel, în cazul omorîrii mușchilor prin expunere timp de 24 de ore la vapori de formaldehidă, sucul mixt conține ionii de potasiu și sodiu în cantitățile cele mai mari, urmînd apoi în ordine descrescîndă: cazul omorîrii prin con-

gelare cu zăpadă carbonică prin păstrare timp de 24 de ore la —10°C şi prin păstrare timp de 24 de ore la +4°C. Aceleaşi constatări rezultă şi din datele prezentate în tabela 2, privind cantităţile de ioni de potasiu şi sodiu din sucurile plasmatice, obţinute de la probe omorîte în moduri diferite. Aşadar, sub acţiunea diferiţilor factori, din biostructură se eliberează cantităţi diferite de ioni.

Tabela 3

Variaţia cantităţii de ioni de sodiu şi potasiu eliminată prin sucul mixt de 1 g ţesut muscular striat (greutate umedă), cu durata acţiunii factorilor care provoacă destrămarea biostructurii. Sucurile mixte au fost obţinute prin stoarcerea unor probe de 45—50 g ţesut omorît timp de 30 min la 150 atm.

Factorul ce determină destrămarea	Timp de acţiune	Na μM/g	K μM/g
Păstrare la 65—70°C	1	10,43	27,70
	2	13,77	54,32
	2,5	21,62	113,90
	3	23,92	115,69
	4	28,30	122,67
Expunere la vapori de formaldehidă	2	9,54	40,36
	16	11,88	53,81
	20	13,11	66,60
	24	16,00*	95,80*

* Cantitatea ionilor de K+ şi Na+ şi din sucul mixt obţinut de la proba de muşchi omorîtă prin expunere la vapori de formaldehidă 24 de ore reprezintă valorile medii a trei determinări.

Teoria biostructurii explică această constatare prin aceea că eliberarea diferitelor substanţe din biostructură depinde de starea în care biostructura se află în momentul destrămării, iar această stare depinde, la rîndul ei, de natura factorilor care acţionează asupra biostructurii. În cazul de faţă, factorul care determină eliberarea cea mai intensă de ioni este reprezentat de vaporii de formaldehidă.

Dacă eliberarea maximă a ionilor de potasiu şi sodiu din biostructură apare în cazul omorîrii muşchilor cu vapori de formaldehidă, se poate presupune că în celelalte cazuri se ajunge numai la eliberarea parţială a acestor ioni. De aceea, pentru aprecierea raportului dintre ionii de potasiu, respectiv de sodiu, din biostructură şi ionii de potasiu, respectiv de sodiu, liberi, din lichidul interstiţial, trebuie ales tocmai cazul cînd eliberarea lor din biostructură este maximă. Calculul arată că rapoartele

$$\frac{\text{K biostructural}}{\text{K interstiţial}} = 3 \text{ şi } \frac{\text{Na biostructural}}{\text{Na interstiţial}} = 1{,}6.$$

În tabela 3 se arată modul cum variază cantităţile ionilor de potasiu şi de sodiu în sucul mixt în timpul acţiunii factorilor care produc moartea ţesutului. Se observă că această cantitate creşte cu atît mai mult, cu cît timpul de expunere a ţesutului muscular la acţiunea factorilor care îl omoară este mai lung. Prin urmare, destrămarea biostructurii din ţesutul muscular striat atunci cînd acesta moare nu se produce deodată, brusc, ci este un proces care evoluează cu timpul.

CONCLUZII

Biostructura ţesutului muscular striat conţine ionii de potasiu şi sodiu în proporţii diferite, şi anume mult mai mult potasiu decît sodiu.

Cantitatea de ioni de potasiu integraţi în biostructură este cu mult mai mare (de 3 ori) decît cea din apa liberă tisulară, pe cînd în cazul ionilor de sodiu aceste cantităţi sînt aproape egale.

Cantitatea de ioni eliberaţi prin destrămarea biostructurii o dată cu moartea depinde de natura factorului care produce moartea şi de durata acţiunii acestui factor asupra ţesutului muscular.

Prezentat la redacţie la 6 aprilie 1971

Institutul de biochimie,
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. E. Macovschi, *Biostructura*, Edit. Academiei, 1969.
2. E. Macovschi, I. Marineanu, Rev. roum. Biochim., **4**, 235 (1967).
3. O. Macovschi, Rev. roum. Biochim., **7**, 201 (1970).
4. E. Macovschi, I. Marineanu, Rev. roum. Biochim., **5**, 257 (1968).

POTASSIUM AND SODIUM IONS IN THE RABBIT STRIATED MUSCLE TISSUE

SUMMARY

Interpretation, from the point of view of the biostructure theory, of the comparative research carried out on the saps obtained by pressing out living or differently killed striated muscle tissue, led to the conclusion that the biostructure of the striated muscle tissue contains much more potassium than sodium. When biostructure breaks down at death, the amount of ions set free depends on the nature as well as on the time action of the agent causing the death of the tissue.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 3, 295–301 (1971)

CONTRIBUȚII LA STUDIUL VITEZEI DE METABOLIZARE A GLUCIDELOR

NATALIA MIHALACHE

Rezumat. — Injectarea concomitentă de glucoză și tiocianat în funcție de greutatea corporală a individului, permite, prin dozări repetate în timp de glucoză și tiocianat, urmărirea revenirii la normal a glicemiei și tiocianatemiei după o curbă cu evoluție semilogaritmică. Din caracteristicile acestei curbe se pot calcula: valoarea lui *K*, coeficientul de asimilație glucidică; *CCS*, consumul celular standard; *CTS*, consumul tisular standard; *Tr*, timpul de retur al glicemiei la valorile normale; *Sp* G, spațiul de glucoză; *Sp* SCN^-, spațiul de tiocianat. Coroborarea acestor date a permis emiterea unei noi clasificări a diabetului în funcție de gradul de perturbare a metabolismului glucidelor, diagnosticarea cazurilor incerte de prediabet și evidențierea faptului că în diabet există o acumulare de glucoză în spațiile interstițiale.

Este cunoscut faptul că diabetul, boală care se instalează fără dureri sau modificări palpabile ale organului afectat, este diagnosticat pe cale de laborator prin determinarea glicemiei și glicozuriei.

Sînt însă destul de frecvente cazurile, în special în diabetul incipient sau în cel compensat, cînd glicozuria lipsește și cînd glicemia se găsește în limite normale. În asemenea cazuri, diagnosticarea se face prin supunerea organismului la un efort metabolic, care constă în administrarea pe cale digestivă sau intravenoasă a unei doze variabile de glucoză.

Evoluția curbei glicemiei dereglate prin acest aport suplimentar, cuplată cu cercetarea glicozuriei, sînt parametri folosiți în precizarea diagnosticului [1] — [7].

Unii dintre pacienți nu beneficiază însă de pe urma acestor metode de hiperglicemie provocată, care îi încadrează în categoriile de prediabet, paradiabet, presupus diabet, presupus sănătos etc. Aceștia au șanse egale de a face sau a nu face diabet.

În lucrarea de față ne-am propus găsirea unei metode de studiu care să permită punerea unui diagnostic corect în aceste cazuri limită nediagnosticate.

MATERIAL ŞI METODĂ

Cercetările noastre au fost făcute pe un număr de 150 de presupuşi diabetici şi 200 de presupuşi sănătoşi, iar verificarea metodei noastre de lucru pentru cazurile certe de diabet şi pentru normali s-a făcut lucrînd în paralel cu metoda Duncan şi Labbée [1], [3] pe 245 de pacienţi.

Bolnavului, nemîncat din seara precedentă, după cel puţin 8 ore de somn, i se injectează, după evacuarea vezicii, 1—2 ml de heparină (5000 u), pentru prevenirea fenomenelor de coagulare, printr-un ac cu mandrin, care rămîne în venă pe tot timpul probei. Prin acest ac se recoltează sînge pentru determinarea glicemiei şi tiocianatemiei (probele-martor). În braţul opus se injectează bolnavului glucoză 50 g% în cantitate de 0,33 g/kg de corp şi tiocianat de sodiu 10 ml dintr-o soluţie 10g%.

După terminarea injectării, care este bine să se facă în maximum 2 min, se recoltează din 5 în 5 min, timp de 1/2 oră, glicemia, iar la interval de 1, 2, 3 şi 4 ore tiocianatemia. În interval de 30 min se prelevează deci 6 glicemii + proba *à jeun*, care se analizează prin metoda Hagedorn [8], iar pentru urmărirea tiocianatemiei se folosesc probele recoltate în interval de 4 ore şi lucrate prin metoda Cachera [9].

Toate aceste date de laborator au fost folosite în felul următor:

1. *Trasarea curbei hiperglicemice.* Conard [6], studiind viteza de variaţie a unei reacţii chimice în condiţii de temperatură date, ajunge la concluzia că legea cea mai probabilă care exprimă viteza de dispariţie a glucozei injectate este o exponenţială de forma

$$C = A \cdot e^{-Kt},$$

în care C este concentraţia glucidică la timpul t, e baza logaritmilor neperieni, iar A şi K constante.

Într-adevăr, înscriind valorile glicemiilor într-un sistem de axe rectangulare, obţinem o curbă exponenţială. dată fiind evoluţia naturală a hiperglicemiei intravenoase după formula

$$G_t = G_0 \cdot e^{-Kt}.$$

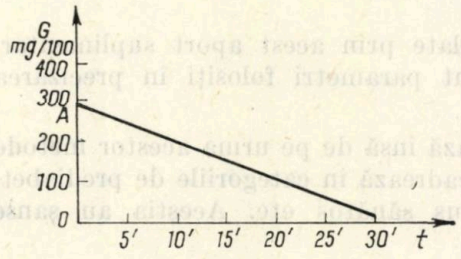


Fig. 1. — Valorile glicemiilor înscrise pe hîrtie semilogaritmică. Pe abscisă sînt înscrise valorile timpului iar pe ordonată valorile glicemiilor.

Aceleaşi valori ale glicemiilor succesive, înscrise pe hîrtie logaritmică, urmează o evoluţie rectilinie, după cum se vede din figura 1.

2. *Coeficientul de pantă K.* Caracteristica cea mai importantă a evoluției hiperglicemiei provocate este viteza cu care ea se desfășoară. În sistemul în care lucrăm, această viteză este reprezentată indirect de coeficientul K al dreptei semilogaritmice. Valoarea lui K se poate afla fie din grafic, calculînd tangenta unghiului pe care dreapta semilogaritmică îl face cu abscisa (fig. 1), fie prin calcul analitic, după formula

$$K = \frac{\log G(t_0 + \varepsilon) - \log G(30')}{30'},$$
$$\varepsilon \to 0$$

în care $\log G(t_0 + \varepsilon)$ reprezintă logaritmul concentrației glicemiei, unde
$\varepsilon \to 0$
dreapta semilogaritmică prin extrapolare întîlnește ordonata (fig. 1, punctul A), iar $\log G(30')$ logaritmul concentrației glicemiei la $t=30$ min.

3. *Spațiul de tiocianat Sp SCN^-* se calculează după formula

$$Sp\ SCN^- = \frac{SCN^-\ (\text{grame})}{SCN^-\ (t_0 + \varepsilon)} \text{ litri.}$$
$$\varepsilon \to 0$$

El reprezintă raportul dintre cantitatea de tiocianat injectată (în grame) și valoarea tiocianatemiei la t_0 și exprimă volumul lichidelor extracelulare.

4. *Spațiul de glucoză Sp G* reprezintă volumul lichidelor în care difuzează glucoza injectată și se calculează după formula

$$Sp\ G = \frac{Gl\ (\text{grame})}{G(t_0 + \varepsilon) - G_0} \text{ litri.}$$
$$\varepsilon \to 0$$

El reprezintă raportul dintre cantitatea de glucoză injectată în grame și diferența de glicemie pe care a creat-o acest surplus glucidic introdus intravenos; $G(t_0 + \varepsilon)$ reprezintă glicemia teoretică la t_0 ce s-ar
$\varepsilon \to 0$
fi obținut dacă injectarea și difuziunea glucozei s-ar fi făcut brusc, iar G_0 glicemia *à jeun.*

Ca aport personal am determinat în continuare:

5. *Timpul de retur Tr.* Acesta reprezintă timpul necesar organismului să consume cantitatea de glucoză injectată. El poate fi calculat din grafic prelungind dreapta semilogaritmică pînă întîlnește orizontala corespunzătoare glicemiei normale, care uneori poate fi chiar abscisa. În cazul cînd glicemia inițială a avut o valoare care depășește limita normalului, se prelungește dreapta semilogaritmică pînă la orizontala corespunzătoare glicemiei de la care s-a pornit. Calculul analitic al Tr se face din formula dreptei semilogaritmice de tipul $y + Kx = n$.

Pentru exemplificare, dacă $n = \log \underset{\varepsilon \to 0}{G(t_0 + \varepsilon)} = 2{,}278$, $K = 0{,}57.10^{-2}$, $y = \log G_0 = 2{,}017$, avem

$$Tr = x = \frac{\log \underset{\varepsilon \to 0}{G(t_0 + \varepsilon)} - \log G_0}{K} = \frac{2{,}278 - 2{,}017}{0{,}0057} = 46 \text{ min.}$$

6. *Consumul tisular standard CTS.* Valoarea consumului celular atunci cînd el este influenţat de factori tisulari, denumit de noi consum tisular standard, am calculat-o după formula

$$CTS = \frac{\text{Gl}.Sp\ \text{G}}{Q\,.\,Tr\,.\,Sp\ \text{SCN}^-}\,.$$

în care Gl reprezintă cantitatea de glucoză injectată, *Sp* G spaţiul de glucoză, *Sp* SCN^- Spaţiul de tiocianat, *Q* greutatea corporală şi *Tr* timpul de retur al glicemiei la valori normale. Valoarea *CTS* se exprimă în mg/kg/min.

7. *Consumul celular standard CCS.* Dacă din formula ce dă valoarea CTS extragem factorul *Sp* G/*Sp* SCN^-, deci facem abstracţie de intervenţia factorilor tisulari, formula care rămîne ne dă posibilitatea să calculăm cantitatea de glucoză metabolizată de către 1 kg de greutate corporală pe minut, sau, cu alte cuvinte, capacitatea metabolică celulară, pe care am numit-o consum celular standard şi am calculat-o după formula

$$CCS = \frac{\text{Gl}}{Q\,.\,Tr},$$

unde *CCS* este raportul dintre cantitatea de glucoză injectată (numărătorul) şi produsul dintre greutatea corporală a bolnavului *Q* şi timpul de retur *Tr* al glicemiei la valoarea normală. *CCS* se exprimă de asemenea în mg/kg/min.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Valorile găsite pentru *K*, *CTS*, *CCS* în condiţiile noastre de lucru la normal şi diabetic sînt expuse în tabela 1.

Spaţiul de tiocianat şi glucoză la normali a avut valori în jurul cifrei de $20 \pm 3\%$ din greutatea corporală. La diabetici apare o diferenţă netă între cei doi coeficienţi, ultimul fiind mult mărit şi ajungînd uneori chiar pînă la valoarea de 50% din greutatea corporală [10].

Valorile referitoare la repartizarea glucozei şi a tiocianatului în organism au fost calculate statistic.

Aşa cum am arătat într-o comunicare anterioară [10], am considerat că această inegalitate se datoreşte unei repartiţii neomogene a glucozei în sectoarele extracelulare, cu preferinţă pentru sectorul interstiţial.

Tabela 1

Coeficienţii vitezei de metabolizare a glucidelor la normal şi diabetic

Categorii	Caracteristici
Sănătos	$K = -1{,}76 \cdot 10^{-2} \pm 0{,}25 \cdot 10^{-2}$ $CTS \approx CCS > 10$ mg/kg/min
Diabet zaharat latent	$K = 0{,}75 \cdot 10^{-2} \pm 0{,}25 \cdot 10^{-2}$ $CCS < 10$ mg/kg/min $CTS > 10$ mg/kg/min
Diabet zaharat patent	$K = -0{,}75 \cdot 10^{-2} \pm 0{,}25 \cdot 10^{-2}$ $CTS \approx CCS < 10$ mg/kg/min
Diabet patent frust	$K = -0{,}75 \cdot 10^{-2} \pm 0{,}25 \cdot 10^{-2}$ $5 > CCS > 1$ mg/kg/min
Diabet patent avansat	$K = -0{,}75 \cdot 10^{-2} \pm 0{,}25 \cdot 10^{-2}$ $CCS < 1$ mg/kg/min

Timpul de retur la normal a fost găsit de circa 30 min, pe cînd la diabetic el este mult prelungit peste această cifră, prezentînd valori diferite care pot fi cuprinse între 50 şi 300 min, ceea ce demonstrează diminuarea capacităţii organismului de a metaboliza glucoza într-un timp mai scurt.

După cum se remarcă şi din tabela 1, studiul acestor coeficienţi a permis să se facă, în funcţie de valoarea lor, o nouă clasificare a diabetului, care suprimă categoriile incerte de prediabet, paradiabet etc.

Tabela 2 arată, în sinteză, rezultatele obţinute cu privire la viteza de metabolizare a glucidelor în cîteva din cazurile rămase neelucidate

Tabela 2

Diagnosticul pus cu ajutorul vitezei de metabolizare a glucidelor în cazurile neelucidate prin metoda Duncan

Tehnica	Categoria	Nr. de cazuri	Viteza de metabolizare		
			Diabet nr. cazuri	Intermediar nr. cazuri	Sănătos nr. cazuri
DUNCAN	Presupus diabet	38	35	1	2
	Presupus sănătos	14	5	1	8

prin metoda Duncan, care este cea mai utilizată dintre probele de hiperglicemie provocate pe cale orală. Aşa după cum am menţionat mai înainte, noţiunile de *CTS*, *CCS* şi *Tr* au fost pentru prima oară introduse de noi în cadrul studiului asupra vitezei de metabolizare a glucidelor. Aceşti parametri ne-au permis diagnosticarea cazurilor de prediabet, rămase neelucidate prin celelalte metode.

Un studiu comparativ făcut între metoda Duncan [3], pe de o parte, şi viteza de metabolizare a glucidelor folosită de noi, pe de altă parte, arată o convergenţă a rezultatelor în cazurile de diabet şi în cele normale. În cazurile-limită pe care metoda amintită mai sus le situează în categoriile de presupus sănătos sau presupus diabetic, putem spune că din categoria de presupus diabet majoritatea sînt diabetici, pe cînd în categoria de presupus sănătos sînt încă multe cazuri de diabet. Aşadar, atît printre presupuşii diabetici, cît şi printre presupuşii sănătoşi se găsesc atît diabetici, cît şi sănătoşi.

Diagnosticul pus de noi a fost urmărit şi verificat pe un interval între 5 şi 10 ani.

CONCLUZII

1. Coeficientul *K* de asimilare glucidică, calculat de Conard, este insuficient pentru diagnosticarea cazurilor de prediabet.

2. Completarea acestui studiu prin calcularea *CCS*, *CTS*, *Sp* G, *Sp* SCN^- şi *Tr*, aşa cum se prezintă ca aport personal în lucrarea de faţă, rezolvă, pe de o parte, această lipsă, dar scoate la iveală o serie de elemente noi, şi anume:

a) se realizează o nouă clasificare a diabetului în raport cu gradul perturbării metabolice. Privită din acest punct de vedere, boala poate fi controlată în timp ca evoluţie şi poate fi urmărit efectul administrării de insulină şi de sulfamide hipoglicemiante;

b) se constată că, la diabetic, spaţiul de glucoză are valori mai mari decît cel de tiocianat, spre deosebire de normal, la care cei doi parametri au aceeaşi valoare;

c) inegalitatea dintre *Sp*G şi *Sp*SCN^- la diabetic se datorează faptului că la diabetic glucoza este răspîndită neomogen în sectoarele extracelulare, cu preferinţă pentru cel interstiţial;

d) timpul de retur la normal este în jur de 30 min, iar la diabet el se prelungeşte uneori chiar pînă la 300 min.

Prezentat la redacţie la 13 februarie 1971

Clinica de boli de metabolism şi nutriţie, I.M.F., Spitalul Cantacuzino, Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. M. Labbée, H. Labbée, F. Nepveux, C. R. Soc. Biol., **85**, 399 (1921).
2. L. Staub-Traugott, Diagnostico Precoce da Diabetes Mellitus Coimbra, 1957.
3. L. J. P. Duncan, Quart I. Exp. Phisiol., *41*, 85 (1956).
4. J. W. Conn, S. S. Fajans, Am. J. Med., **31**, 839 (1961).
5. V. Conard, Presse Med., **66**, 1976 (1958).
6. V. Conard, *Mesure de l'assimilation glucidique*, Ed. Acta Medica Belgica, Bruxelles, 1955.
7. L. Pavel, R. Pieptea, N. Mihalachi, Sem. Hôp., *44—45*, 2219 (1958).
8. H. C. Hagedorn, B. Jensen, Biochem. Z., **46**, 135 (1923).
9. R. Cahera, M. Lamotte, Sem. Hôp., **26**, 500 (1950).
10. I. Pavel, R. Pieptea, N. Mihalache, Intern. Symp. über Diabetesfragen, Karlsburg, Greisfwald, *3*, 109 (1964).

CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF THE RATE OF CARBOHYDRATE METABOLISM

SUMMARY

After simultaneous glucose and thiocyanate injection, depending on the individual body weight, the recovery of the glycaemia and thiocyanaemia, according to a semi-logarithmic curve can be followed by repeated glucose and thiocyanate assays.

The values of K, the coefficient of carbohydrate assimilation, SCC (standard cell consumption), STC (standard tissular consumption), Tr (time of recovery), Gs (glucose space), SCN^- Sp (thiocyanate space) can be calculated out of the characteristic values of this curve.

The corroboration of these data allowed to suggest a new classification of the diabetes, in terms of the degree of carbohydrate metabolism disturbance, to determine the diagnosis in doubtful prediabetes cases and to emphasize the fact that there is an accumulation of glucose within the interstitial space in the diabetic disease.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 3, 303–309 (1971)

PARAMETRII OPTIMI DE ACȚIUNE AI PIROFOSFAT-FOSFOHIDROLAZEI DIN SEMINȚELE DE LATIR (*LATHYRUS SATIVUS* L.)

S. NICULESCU și DANA IORDĂCHESCU

Rezumat. — În vederea selecționării unui material vegetal pentru studiul activității pirofosfat-fosfohidrolazei au fost utilizate semințele diferitelor specii de leguminoase. O bogată activitate enzimatică a fost depistată în extractele obținute din pudra acetonică a semințelor de latir (*Lathyrus sativus*). Folosind diferite medii de extracție, s-au putut determina condițiile optime de extracție ale enzimei. Activitatea pirofosfat-fosfohidrolazică este concentrată în supernatantul fracțiunii mitocondriale. În cursul primelor patru zile de germinare, activitatea enzimatică crește.

Izolarea, purificarea și cristalizarea pirofosfatazelor de origine vegetală, precum și studiul repartiției lor în celulă, au fost mai puțin abordate în literatura de specialitate.

Heppel și Hilmoe [1] sînt primii care reușesc să purifice de aproximativ 200 de ori pirofosfat-fosfohidrolaza extrasă din drojdia de bere, iar un an mai tîrziu, Kunitz [2] obține primele cristale de pirofosfatază anorganică, pornind de la aceeași sursă.

În 1966 Josse purifică această enzimă dintr-o sursă microbiană, *E. coli*, realizînd în final cristalizarea ei [3].

Naganna și colab. [4], efectuînd un studiu complet al enzimei extrase din cartofi, stabilesc existența a două pirofosfat-fosfohidrolaze: una acidă, cu un pH optim de acțiune la 5,3, și alta alcalină, cu un pH optim de 8,7 (în prezența obligatorie a ionilor de magneziu).

În 1964, Sripati și Sarma [5] descriu un procedeu de purificare a pirofosfat-fosfohidrolazei acide extrase din fasole (*Phaseolus vulgaris* L.).

Scopul prezentei lucrări constă în: selecționarea unui material vegetal mai bogat în proteină cu activitate pirofosfat-fosfohidrolazică (EC 3.6.1.1.), determinarea condițiilor optime de extracție a enzimei din materialul ales, studiul unor proprietăți fizico-chimice ale pirofosfat-fosfohidrolazei, studiul repartiției acesteia în celulă și al variației activității enzimatice în cursul procesului de germinare.

MATERIAL ŞI METODE

În vederea alegerii unei surse bogate în activitate pirofosfat-fosfohidrolazică au fost luate în studiu seminţe mature ale următoarelor specii de leguminoase : fasole (*Phaseolus vulgaris*), mazăre (*Pisum sativum*), soia (*Glycine hispida* var. *Chepeewa*), latir (*Lathyrus sativus*), bob (*Vicia faba minor*) şi năut (*Cicer arietinum*).

Seminţele acestor leguminoase au fost mojarate şi degresate cu acetonă [6]. Extracţia proteinelor a fost realizată prin tratarea a 2 g de pudră acetonică cu 40 ml de mediu de extracţie timp de o oră la 4°C. Omogenatul astfel obţinut a fost centrifugat la 8 000 × g timp de 20 min.

Separarea mitocondriilor s-a efectuat după procedeul descris de Jaarma [7], integritatea lor funcţională fiind cercetată prin metoda Warburg [8].

Concentraţia în proteină a extractelor a fost determinată cu ajutorul metodei descrise de Lowry şi colab. [9], folosindu-se pentru obţinerea curbei-etalon albumina serică bovină cristalizată.

Activitatea pirofosfat-fosfohidrolazică a fost determinată dozîndu-se prin metoda Fiske-Subbarow ortofosfatul eliberat în urma hidrolizei enzimatice într-un volum final de 4 ml.

Activitatea specifică a enzimei a fost exprimată în unităţi EC I.U.B. : μ moli P_i/mg proteină/min/38°C.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Activitatea pirofosfat-fosfohidrolazei acide obţinute din pudra acetonică a diferitelor seminţe leguminoase este redată în figura 1. După cum reiese din figură, seminţele de latir şi de fasole prezintă cea mai mare activitate pirofosfat-fosfohidrolazică. Dintre cele două specii de leguminoase cu activitate enzimatică mai mare, am optat pentru seminţele de latir, avînd în vedere unele considerente de tehnică experimentală (uşurinţa degresării).

Următoarea etapă experimentală a constat în stabilirea unui mediu în care extracţia proteinelor din pudra acetonică a seminţelor de latir să fie maximă şi selectivă. Rezultatele unei experienţe tip sînt redate în tabela 1. Analizînd rezultatele din tabela 1, se constată că activitatea specifică maximă se obţine prin extracţie cu NaCl. Folosind două molarităţi diferite, se observă că tăria ionică a soluţiei saline practic nu influenţează extracţia. Menţionăm acest fapt, deoarece în experienţe anterioare [11] asupra pirofosfat-fosfohidrolazei alcaline izolate din seminţe de fasole şi de mazăre am constatat că puterea de extracţie creşte cu scăderea molarităţii soluţiei saline. Deoarece soluţia de NaCl $5 \cdot 10^{-2}$ M permite extracţia selectivă a proteinei cu activitate pirofosfatazică, în experienţele următoare am folosit acest mediu.

Cercetînd în condiţiile stabilite anterior repartiţia în celulă a pirofosfat-fosfohidrolazei, am constatat că activitatea enzimatică este depistată numai în supernatantul rezultat după centrifugarea extractului

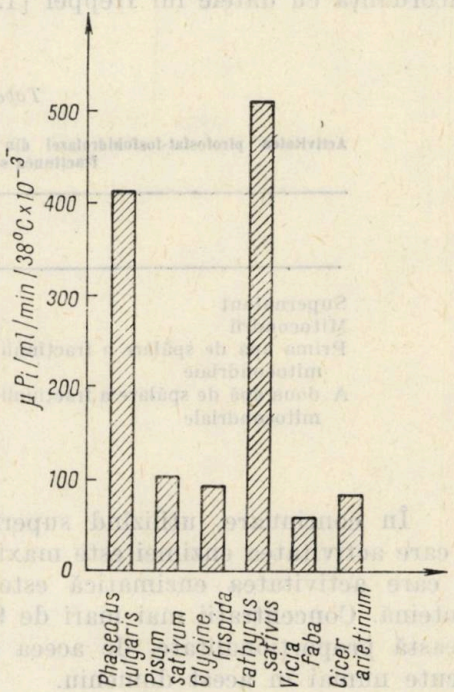


Fig. 1. — Activitatea pirofosfat-fosfohidrolazei obţinută de la diferite specii de leguminoase (extracţia s-a efectuat cu ajutorul unei soluţii de NaCl 5 10^{-2} M).

proteic la 8 000 × g. Pentru a preciza localizarea enzimei în celulă, am procedat la separarea fracţiunii mitocondriale. A fost determinată activitatea enzimatică în mitocondrii, în apele lor de spălare şi în superna-

Tabela 1

Activitatea pirofosfat-fosfohidrolazei din extractele obţinute cu diferite soluţii a pulberii acetonice de seminţe de latir

Mediu de extracţie	Proteină mg/ml	Activitatea enzimatică	
		μ moli P_i/min/ml/38°C × 10^{-3}	μ moli P_i /min/mg prot./38°C × 10^{-3}
Apă	9,6	528	55,0
Brij	9,2	588	63,8
Taurocolat Na 0,01 %	6,5	555	83,8
Dezoxicolat Na 0,01 %	7,0	589	84,1
NaCl 0,05 M	4,1	524	122,9
NaCl 0,1 M	4,1	492	120,0
Tampon acid acetic/acetat 0,05 M, pH 6,2	3,9	362	93,0
Laurilsulfat Na 0,01 %	7,2	588	81,6

tantul obţinut. Media a şase determinări este redată în tabela 2. După um reiese din această tabelă, majoritatea activităţii pirofosfat-fosfohidrolazice este depistată în supernatant; o oarecare activitate enzimatică posedă şi fracţiunea mitocondrială. Rezultatele noastre sînt în bună oncordanţă cu datele lui Heppel [12].

Tabela 2

Activitatea pirofosfat-fosfohidrolazei din seminţele de latir, în mitocondrii şi în fracţiunea solubilă a lor

	Activitatea enzimatică μ moli P_i/ml/min/38°C $\times 10^{-3}$
Supernatant	416,8
Mitocondrii	30,64
Prima apă de spălare a fracţiunii mitocondriale	104,2
A doua apă de spălare a fracţiunii mitocondriale	42,2

În continuare, utilizînd supernatantul, am stabilit unii parametri la care activitatea enzimei este maximă. În figura 2 este redat domeniul în care activitatea enzimatică este proporţională cu concentraţia de proteină. Concentraţii mai mari de 9,5 mg/ml proteină nu mai respectă această proporţionalitate, de aceea determinările experimentale trebuie făcute numai în acest domeniu.

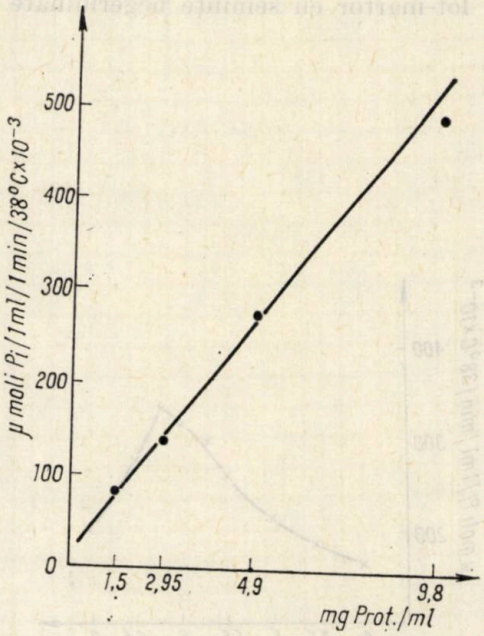
A fost studiată şi influenţa concentraţiei substratului asupra vitezei de reacţie. După cum reiese din figura 3, viteza de reacţie creşte proporţional cu concentraţia substratului pînă la valoarea de 15 μ moli pirofosfat. În domeniul 15—20μ moli pirofosfat în mediul de reacţie, viteza de hidroliză enzimatică rămîne constantă. Concentraţii mai mari de 20μ moli pirofosfat devin inhibitoare. Inhibarea reacţiei enzimatice la concentraţii mari de substrat a fost observată şi în cazul pirofosfat-fosfohidrolazei izolate din drojdia de bere [2], din ficatul de şobolan [13], din cartofi [4] şi de noi în studiul unor pirofosfataze alcaline vegetale [11].

A fost studiată de asemenea influenţa concentraţiei ionilor de hidrogen asupra pirofosfat-fosfohidrolazei acide. Figura 4 redă variaţia activităţii pirofosfat-fosfohidrolazei în funcţie de pH în soluţie-tampon acid acetic/acetat, $5 \cdot 10^{-2}$ M. Se constată că pH-ul optim este 6,2, în concordanţă cu datele din literatură [13] — [15].

Urmărind mersul reacţiei enzimatice în decurs de 60 min, am constatat că activitatea enzimatică creşte proporţional numai în primele 30 min de la iniţierea reacţiei (fig. 5).

Evoluţia activităţii pirofosfat-fosfohidrolazei anorganice la seminţele de latir germinate la întuneric şi la temperatură constantă la 24°C,

Fig. 2. — Activitatea pirofosfat-fosfohidrolazei în funcție de concentrația proteinei din extract.



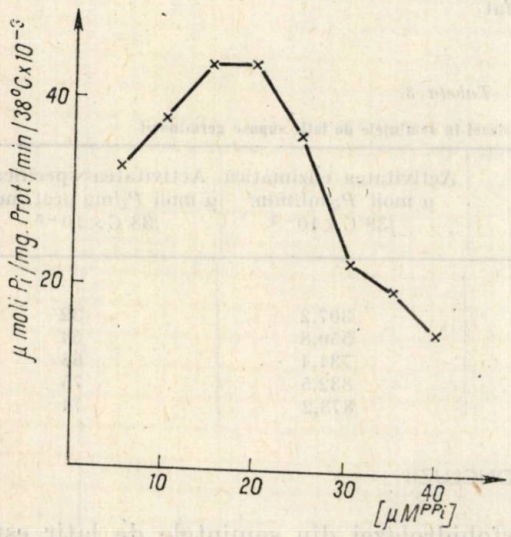


Fig. 3. — Influența concentrației de substrat asupra activității pirofosfat-fosfohidrolazei.

timp de 24, 48, 72 şi, respectiv, 96 de ore a arătat că în primele trei zile de germinare activitatea enzimatică creşte în raport cu aceea a unui lot-martor cu seminţe negerminate (tabela 3).

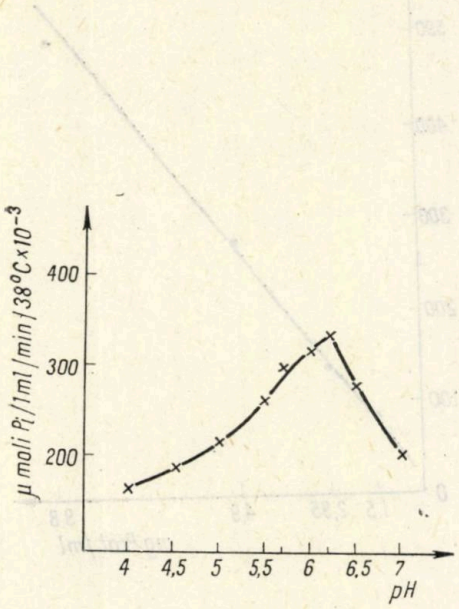


Fig. 4. — Activitatea pirofosfat-fosfohidrolazei exprimată în μ moli P_i/ml/min/38°C la diferite valori de pH (concentraţia în proteină 1,28 mg/0,5 ml; concentraţia în pirofosfat 20 μ moli).

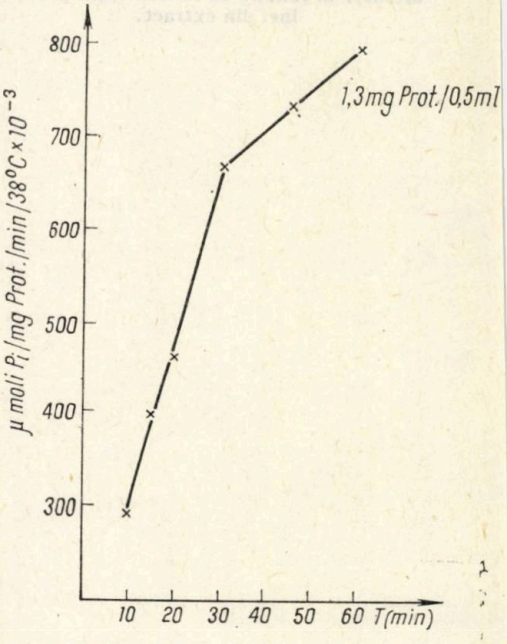


Fig. 5. — Variaţia activităţii pirofosfat-fosfohidrolazei în timp.

Tabela 3

Activitatea pirofosfat-fosfohidrolazei în seminţele de latir supuse germinării

Timp de germinare ore	Proteine mg/ml	Activitatea enzimatică μ moli P_i/ml/min/ /38°C × 10^{-3}	Activitatea specifică μ moli P_i/mg prot./min/ /38°C × 10^{-3}
Lot-martor negerminat	9,6	307,2	32
24	10,2	550,8	54
48	10,8	734,4	68
72	11,1	832,5	75
96	11,8	873,2	74

CONCLUZII

1. Activitatea pirofosfat-fosfohidrolazei din seminţele de latir este maximă în soluţie-tampon acid acetic/acetat de sodiu, $5 \cdot 10^{-2}$ M, pH = 6,2, şi la o concentraţie a substratului de 20 μ moli.

2. Activitatea pirofosfat-fosfohidrolazei în extractele enzimatice nepurificate obţinute din seminţele de latir este localizată în supernatantul fracţiunii mitocondriale.

3. În decursul primelor 96 de ore de germinare, activitatea pirofosfat-fosfohidrolazei creşte.

Prezentat la redacţie la 24 martie 1971

Facultatea de biologie,
Catedra de biochimie, Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. L. A. Heppel, R. J. Hilmoe, J. biol. Chem., **192**, 87 (1951).
2. M. Kunitz, J. Gen. Physiol., **35**, 423 (1952).
3. J. Josse, J. biol. Chem., **241**, 1938 (1966).
4. B. Naganna, A. Raman, B. Venugopal, C. E. Sripati, Biochem., J., **60**, 215 (1955).
5. C. E. Sripati, P. S. Sarma, Ind. J. Biochem., **1**, 173 (1964).
6. J. L. Bailey, *Techniques in Protein Chemistry*, Elsevier Publ. Co., Amsterdam—Londra—New York, 1967, p. 280.
7. M. Jaarma, Acta Chem. Scand., **21**, 2069 (1967).
8. W. W. Umbreit, R. H. Burris, J. F. Stauffer, *Manometric techniques and tissue metabolism*, Burgess Publ. Co., Minneapolis, 1951, p. 1—16.
9. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, L. A. Farr, R. J. Randall, J. biol. Chem., **193**, 265 (1951).
10. C. H. Fiske, Y. Subbarow, J. biol. Chem., **66**, 375 (1925).
11. I. F. Dumitru, S. Niculescu, Romanian Biochemical Letters, p. 17, 1970.
12. L. A. Heppel, Science, **156**, 1451 (1967).
13. A. M. Swanson, J. biol. Chem., **194**, 685 (1952).
14. S. M. Avaeva, S. N. Kara-Murza, M. M. Botvinik, Biohimiia, **32**, 205 (1967).
15. S. M. Avaeva, A. T. Mevkh, Biohimiia, **35**, 552 (1970).

OPTIMAL PARAMETERS OF PYROPHOSPHATE-PHOSPHOHYDROLASE ACTION IN SEEDS OF *LATHYRUS SATIVUS* L.

SUMMARY

In order to select a vegetal material for the study of pyrophosphate-phosphohydrolase activity, several species of leguminous plants were utilized. An important enzymatic activity was found in the extracts obtained from the acetonic powder of *Lathyrus sativus* seeds. Using different extraction solutions optimal extraction conditions for the enzyme were established. The total pyrophosphate-phosphohydrolase activity is concentrated in the supernatant of the mitochondrial fraction. During the first 4 days of the germination, the enzymatic activity rises.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 3, 311–317 (1971)

ACȚIUNEA UNOR EFECTORI ASUPRA ACTIVITĂȚII FOSFATAZEI ACIDE DIN GRÎU

DOINA POPOV

Rezumat. — Activitatea fosfatazei acide nespecifice din semințele de grîu negerminate, germinate și din frunze a fost analizată față de β-glicerofosfat ca substrat în două sisteme-tampon: acid citric — citrat de sodiu și acid succinic — NaOH. Enzima etapelor cercetate prezintă valori apropiate ale pH-ului optim, cuprinse între 5,5 și 6,2. În sistemul-tampon acid succinic — NaOH se constată o activitate fosfatazică de 2—4 ori mai mare decît în sistemul-tampon acid citric — citrat. Efectorii adăugați mediului de reacție în funcție de acțiunea lor asupra activității fosfatazei acide din grîu se pot clasa în ioni cu acțiune diferențiată, depinzînd de perioada de vegetație din care provine enzima, și ioni cu o influență generală, indiferent de perioada de vegetație analizată.

Una din căile de cercetare a proprietăților enzimelor este urmărirea activității lor în prezența diferiților efectori adăugați mediului de reacție. Astfel, într-o lucrare anterioară [1], efectuată asupra fosfatazei acide din porumb, am constatat că ionii adăugați mediului de reacție au un efect similar, unitar, asupra enzimei din formațiile aceleiași etape de dezvoltare, dar diferit în funcție de perioada de vegetație analizată. Rezultatele din literatură referitoare la influența efectorilor asupra fosfatazei acide din grîu pot fi însă cu greu corelate, din cauza diversității etapelor de vegetație urmărite [2] — [6], a condițiilor diferite de obținere a extractelor cu activitate fosfatazică [2], [4] — [6] și a utilizării unor condiții diferite de reacție, cum ar fi soluții-tampon diferite [2], [4], [5], substrate diferite [2] — [5] etc.

Cercetările noastre anterioare asupra fosfatazei acide din grîu în primele etape de creștere [7] au sesizat variații, în funcție de perioada de vegetație analizată, atît ale intensității activității fosfatazice globale, cît și ale aspectului enzimogramelor acestei enzime. Pentru a cerceta proprietățile fosfatazei acide din diferitele etape de vegetație ale grîului (sămînță negerminată, sămînță germinată și primele frunze), ne-am propus în lucrarea de față urmărirea comportării enzimei în prezența unor efectori adăugați mediului de reacție.

MATERIAL ŞI METODE

S-au folosit seminţe de grîu de toamnă, procurate de la I.C.C.P.T.-Fundulea.

Cercetarea s-a efectuat pe făina seminţelor negerminate, pe plantulele şi pe restul seminţei (scutel plus endosperm), separate după 5 zile de germinare, precum şi pe frunzele de grîu, recoltate la 10 zile după semănare (7 zile de la răsărire). Extractele acestora s-au obţinut în NaCl $9^0/_{00}$, în condiţiile de lucru descrise într-o lucrare anterioară [7].

Determinarea activităţii fosfatazei acide s-a făcut după modificarea Portocală-Popa a metodei Fiske-Subbarow [8], avînd ca substrat β-glicerofosfatul de sodiu. Activitatea enzimei s-a determinat în două sisteme-tampon : acid citric — citrat de sodiu 0,1 M, tampon întrebuinţat cel mai des în literatură, şi acid succinic — NaOH 0,2 M, soluţie-tampon în care noi am observat o activitate maximă a fosfatazei acide din porumb [1].

Efectorii s-au adăugat în mediul de reacţie în concentraţii de $2 \cdot 10^{-2}$M. Aceştia au fost $Ca(NO_3)_2$, $Mg(NO_3)_2$, $Pb(NO_3)_2$, $ZnSO_4$, $HgCl_2$, $Cu(CH_3COO)_2$, $MgCl_2$, $Pb(CH_3COO)_2$, $MnCl_2$, EDTA·Na_2, acid citric, acid succinic, $K_2C_2O_4$ şi molibdat de amoniu. Gradul de activare sau de inhibare a probelor care conţin efectori s-a calculat în procente din activitatea probelor-martor, lipsite de efectori.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

pH-ul optim al activităţii fosfatazice. Pentru determinarea pH-ului optim de acţiune al fosfatazei acide din formaţiunile şi din organele grîului în primele etape de creştere, am urmărit activitatea acestora în tampon acid citric — citrat şi acid succinic — NaOH la opt valori de pH, cuprinse între 3,6 şi 7 (fig. 1). Întrucît β-glicerofosfatul de sodiu este un substrat ionic, pH-ul optim al enzimei s-a determinat chiar în amestecul de reacţie. Enzima din făina seminţelor negerminate are în tamponul citrat pH-ul optim = 6,2, valoare apropiată de pH = 6,0 găsit de Cohen şi colab. [2] ca fiind optim, în tampon acetat, pentru enzima din germenii seminţelor neîncolţite de grîu. În tamponul acid succinic — NaOH, optimul de pH este situat într-o zonă mai largă, cuprinsă între 5,0 şi 5,9. Enzima plantulei şi cea a restului seminţei prezintă activitate optimă în tamponul acid citric — citrat la pH cuprins între 5,0 şi 5,75. Aceleaşi valori s-au găsit şi în tamponul acid succinic — NaOH. În cazul frunzelor s-a lucrat în tamponul acid citric — citrat de pH = 5,7, valoare găsită şi de Roberts [4] ca fiind optimă pentru enzima acestora. În tamponul succinat, pH-ul optim este 5,5.

Se observă deci că formaţiunile şi organele analizate prezintă activităţi optime la valori apropiate de pH, indicînd existenţa unor caracteristici comune ale enzimei lor.

Acţiunea diverşilor ioni asupra activităţii fosfatazei acide. Acţiunea unor ioni asupra activităţii fosfatazei acide din grîu în primele etape de

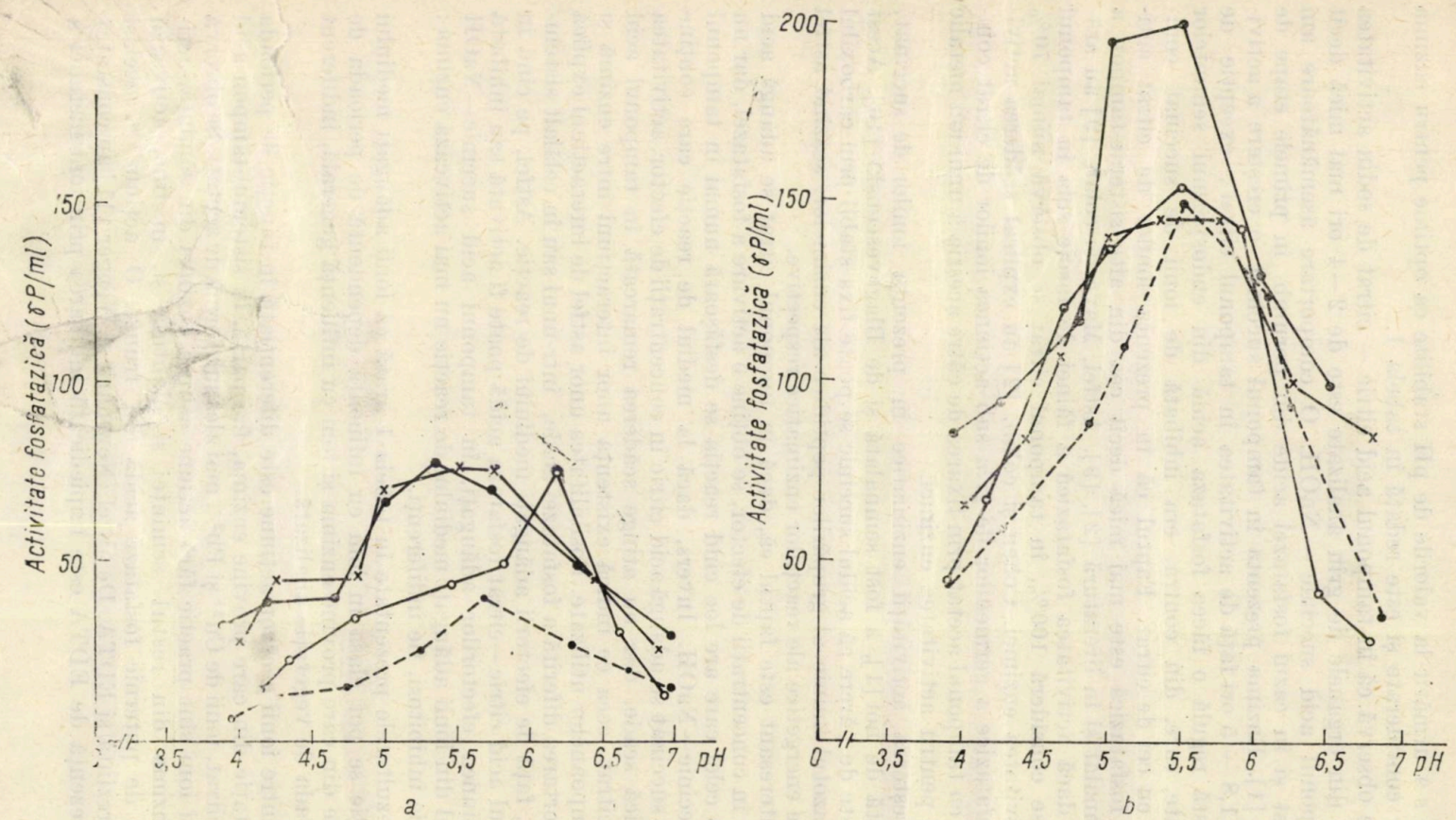


Fig. 1. — Activitatea fosfatazei acide din grîu în primele etape de creştere la diferite valori de pH.

a - În tampon acid citric – citrat 0,1 M; *b* – în tampon acid succinic – NaOH 0,2 M. o——o Făina seminţelor negerminate; ●——● restul seminţei; ×——× plantule; – – – frunze. Condiţiile de obţinere a extractelor vegetale şi de determinare a activităţii lor au fost aceleaşi ca în tabela 1.

creştere s-a urmărit la valorile de pH stabilite ca optime pentru enzima etapelor considerate şi este redată în tabela 1.

Se observă că în tamponul acid citric — citrat de sodiu activitatea enzimei din organele de grîu analizate este de 2—4 ori mai mică decît în tamponul acid succinic — NaOH. O comportare asemănătoare am constatat şi în cazul fosfatazei acide din porumb în primele etape de creştere [1]. Enzima prezenta în tamponul succinat o creştere a activităţii de 1,8 — 5 ori faţă de activitatea în tamponul citrat; excepţie de la această regulă o făcea fosfataza acidă din endospermul seminţelor germinate, care, din contra, era inhibată de ionii de succinat comparativ cu cei de citrat. Faptul că în prezenţa ionilor de citrat activitatea fosfatazică este mai mică decît cea din alte sisteme-tampon a fost semnalat şi în literatură [2], [9]. Astfel, Mayer şi colab. [9] au arătat că, dacă activitatea fosfatazică a făinei de fasole soia în tamponul acetat se consideră 100%, în tamponul citrat se observă numai 70% din activitatea enzimei. Cohen şi colab. [2] au explicat scăderea activităţii fosfatazice a germenilor de grîu sub acţiunea ionilor de citrat comparativ cu tamponul acetat prin fixarea de către aceştia a unui ion metalic esenţial pentru activitatea enzimei.

Creşterea activităţii enzimatice în prezenţa ionilor de succinat, observată de noi [1], a fost semnalată şi de Blagovescenski [10]. Acest autor este de părere că acidul succinic se poate fixa stabil prin carboxilul său de azotul iminic al grupărilor peptidice ale enzimelor, scăzînd astfel barierele energetice ale reacţiilor enzimatice respective.

Interesant este faptul că, dacă în tamponul citrat se adaugă acid succinic în concentraţii de efector, se obţine o activare a fosfatazei, dar nu identică celei care are loc cînd reacţia se desfăşoară numai în tamponul acid succinic—NaOH. Invers, dacă la mediul de reacţie care conţine tampon succinat se adaugă acid citric în concentraţii de efector, activitatea fosfatazică scade, dar nu atinge scăderea remarcată în tamponul acid citric—citrat, ceea ce indică existenţa unor interacţiuni între enzimă şi ionii tampoanelor utilizate. Posibilitatea unor astfel de interacţiuni explică şi comportarea diferită a fosfatazei acide, într-unul sau în celălalt sistem-tampon, faţă de efectorii adăugaţi mediului de reacţie. Astfel, pe cînd în tamponul acid citric—citrat fosfataza acidă poate fi activată sau inhibată sub acţiunea efectorilor adăugaţi, în tamponul acid succinic—NaOH nici unul din ionii adăugaţi mediului de reacţie nu mai activează enzima; ei sînt fie inhibitori, fie indiferenţi.

Rezultatele prezentate în tabela 1 arată că ionii adăugaţi mediului de reacţie se pot clasa în ioni cu influenţă dependentă de perioada de vegetaţie din care provine enzima şi ioni cu influenţă generală, indiferent de perioada de vegetaţie analizată.

Dintre ionii a căror acţiune este diferenţiată în funcţie de perioada de vegetaţie din care provine enzima, fac parte, în sistemul-tampon acid citric—citrat, ionii de Cu^{2+} şi Pb^{2+}, mai ales sub formă de acetaţi. Se observă că aceşti ioni sînt practic fără acţiune asupra enzimei din sămînţă, activează enzima din restul seminţei şi plantulă şi, în fine, activează deosebit de puternic fosfataza acidă din frunze. O acţiune în acelaşi sens o prezintă şi EDTA. De altfel, Newmark şi Wenger [11] au constatat că în prezenţă de EDTA este împiedicată inhibarea prin ioni metalici a

Tabela 1

Influența ionilor asupra activității fosfatazei acide din grîu în primele etape de creștere

Faza de vegetație	Semințe negerminate	Semințe germinate 5 zile		Frunze (7 zile de la răsărire)
		restul seminței	plantule	
Raportul de extracție (ml/g)	2/1	1,5/1	1/1	0,4/1
Cantitatea de extract folosită (ml)	2	1	1	0,5
ml folosiți la dozarea fosforului eliberat	7	6	6	6

	Determinări în tamponul acid citric—citrat de sodiu							
	γP	%	γP	%	γP	%	γP	%
Martor	73	100	70	100	72	100	38	100
$Ca(NO_3)_2$	77	105	100	143	97	135	44	117
$Mg(NO_3)_2$	75	102	80	115	112	155	48	128
$Pb(NO_3)_2$	73	100	113	161	114	159	58	153
$ZnSO_4$	51	70	80	115	91	127	48	128
$HgCl_2$	50	69	24	34	19	27	20	52
$Cu(CH_3COO)_2$	73	100	90	129	124	172	79	209
$MgCl_2$	73	100	98	140	118	164	46	122
$Pb(CH_3COO)_2$	73	100	94	135	114	159	83	219
$MnCl_2$	69	95	83	118	74	103	56	147
EDTA·Na_2	73	100	102	146	93	129	57	150
Acid succinic	109	149	102	146	99	141	59	157
$K_2C_2O_4$	49	68	74	81	45	63	27	71
$(NH_4)_2MoO_4$	23	32	23	33	14	20	11	30
	Determinări în tamponul acid succinic — NaOH							
	γP	%	γP	%	γP	%	γP	%
Martor	143	100	201	100	147	100	156	100
$Ca(NO_3)_2$	131	92	171	85	168	114	154	99
$Mg(NO_3)_2$	140	98	183	91	178	119	154	99
$Pb(NO_3)_2$	140	98	209	104	148	101	150	96
$ZnSO_4$	86	60	42	21	37	25	34	22
$HgCl_2$	90	63	22	11	18	12	12	8
$Cu(CH_3COO)_2$	89	62	36	18	29	20	11	7
$MgCl_2$	140	98	223	111	162	110	159	102
$Pb(CH_3COO)_2$	137	96	209	104	140	95	150	96
$MnCl_2$	128	90	183	91	137	93	145	93
EDTA·Na_2	143	100	211	105	170	116	128	82
Acid citric	121	85	213	106	132	90	117	75
$K_2C_2O_4$	86	60	189	94	119	81	143	92
$(NH_4)_2MoO_4$	14	10	16	8	13	9	3	2

fosfatazei acide din plantulele de lupin. Ionii de Mg^{2+}, Ca^{2+}, Mn^{2+} şi Zn^{2+} sînt activatori, dar mai puţin eficienţi, ai fosfatazei acide din grîu, în tamponul citrat. Dintre inhibitori se remarcă Hg^{2+}, care inhibă slab enzima din făina seminţelor negerminate, dar puternic pe cea din organele seminţei germinate şi din frunze.

În sistemul-tampon acid succinic—NaOH se observă inhibarea diferenţiată exercitată de ionii de Hg^{2+} şi Cu^{2+}. Aceştia inhibă în mică măsură enzima din făina seminţelor negerminate şi foarte puternic fosfataza acidă din organele seminţei germinate şi din frunze. O acţiune inhibitoare de acelaşi gen o prezintă ionii de Zn^{2+} şi $C_2O_4^{2-}$. Acţiunea diferită exercitată de ionii de Hg^{2+} asupra fosfatazei acide în diferitele perioade de vegetaţie ale grîului s-ar putea explica prin existenţa unui număr redus de grupări —SH libere la suprafaţa enzimei seminţelor negerminate. Pe măsură ce germinarea avansează, o dată cu creşterea activităţii fosfatazei acide se produc modificări ale structurii acesteia, reprezentate, printre altele, de o mărire a numărului de grupări —SH libere [12].

Existenţa unor ioni a căror influenţă asupra fosfatazei acide depinde de perioada de vegetaţie din care provine enzima reprezintă o dovadă a modificărilor pe care le suferă fosfataza acidă în primele etape de creştere ale grîului. Aceste diferenţe sînt mult mai nete în cazul enzimei din porumb [1] comparativ cu cea din grîu. Comportarea diferită a fosfatazei grîului faţă de cea din porumb nu este datorată concentraţiei efectorului utilizat, deoarece, testîndu-se activitatea fosfatazei din grîu în prezenţa concentraţiilor de efectori folosite la porumb, efectele observate au fost aceleaşi.

Dintre ionii a căror acţiune asupra fosfatazei acide este independentă de perioada de vegetaţie analizată, remarcăm în tamponul citrat ca activatori ionii de succinat, iar ca inhibitori ionii de oxalat şi molibdat. În tamponul acid succinic—NaOH, ionii de Mg^{2+}, Mn^{2+} şi Pb^{2+} nu modifică semnificativ activitatea fosfatazei, pe cînd ionii de Zn^{2+}, molibdat şi citrat sînt inhibitori ai acesteia. Existenţa unor ioni a căror acţiune asupra fosfatazei acide este independentă de perioada de vegetaţie a plantei din care provine enzima susţine ideea diferenţierii nete a fosfatazei acide din grîu comparativ cu cea din porumb. O astfel de presupunere este justificată şi de valorile apropiate ale pH-ului optim al fosfatazei acide din grîu în primele etape de creştere comparativ cu enzima din porumb.

CONCLUZII

1. Fosfataza acidă din grîu, în primele etape de creştere, prezintă valori ale pH-ului optim cuprinse între 5,5 şi 6,2.

2. Activitatea fosfatazică faţă de β-glicerofosfat ca substrat prezintă valori diferite în cele două sisteme-tampon: acid citric—citrat şi acid succinic—NaOH; în tamponul citrat, activitatea fosfatazică este de 2—4 ori mai mică decît în tamponul acid succinic—NaOH.

3. Dintre ionii adăugaţi mediului de reacţie, unii au o acţiune diferenţiată asupra fosfatazei acide din grîu, depinzînd de perioada de vegetaţie

din care provine enzima, iar alţii au o influenţă generală, indiferent de perioada de vegetaţie analizată.

Prezentat la redacţie la 24 martie 1971

Institutul de biochimie,
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. V. Alexandrescu, D. Popov, St. cerc. biochim., **12**, 121 (1969).
2. W. Cohen, M. Bier, F. F. Nord, Arch. Biochem. Biophys., **76**, 204 (1958).
3. C. Anagnostopoulos, A. Lino, Bul. Soc. Chim. Biol., **40**, 1045 (1958).
4. D. W. A. Roberts, J. Biol. Chem., **219**, 711 (1956).
5. D. W. A. Roberts, J. Biol. Chem., **230**, 213 (1958).
6. D. W. A. Roberts, Canad, J. Biochem. Physiol., **41**, 113 (1963).
7. V. Alexandrescu, D. Popov, Rev. roum. Biochem., **7**, 85 (1970).
8. R. Portocală, L. Popa, *Acizii ribonucleici celulari şi virali*, Edit. Academiei, Bucureşti, 1966, 318 p.
9. F. C. Mayer, R. E. Campbell, A. K. Smith, L. L. Mc Kinney, Arch. Biochem Biophys., **94**, 301 (1961).
10. A. V. Blagoveşcenski, Biol. Abstr., **51**, nr. 39904 (1970).
11. M. Z. Newmark, B. S. Wenger, Arch. Biochem. Biophys., **89**, 110 (1960).
12. W. Ruhland, *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Springer-Verlag, Berlin—Göttingen—Heidelberg, 1958, VIII, 581 p.

THE INFLUENCE OF SOME EFFECTORS ON THE ACTIVITY OF WHEAT ACID PHOSPHATASE

SUMMARY

The activity of the non-specific acid phosphatase of nongerminated and germinated wheat seeds, as well as that of the leaves was determined with Na-β-glycerophosphate as substrate in two buffer systems: citric acid—citrate and succinic acid—NaOH. For the vegetative periods under study the enzyme evinces close values of the optimum pH ranging from 5.5 to 6.2. An enzymic activity 2—4 fold greater has been observed in succinic acid—NaOH buffer as compared with citric acid—citrate. The effectors added to the reaction mixture can be divided into two classes in terms of their action upon the wheat acid phosphatase activity: a) ions with a differentiate influence depending on the vegetative period supplying the enzyme, and b) ions with a general influence, irrespective of the vegetative period studied.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 3, 319–326 (1971)

INFLUENȚA IONULUI DE RUBIDIU ASUPRA CONȚINUTULUI ÎN ACID PIRUVIC, ÎN APĂ TOTALĂ PRECUM ȘI ASUPRA EXOSMOZEI ACIDULUI PIRUVIC DIN MUȘCHIUL SARTORIUS DE BROASCĂ

LORA SCOLNIC

Rezumat. — Ionul de rubidiu introdus în mediul de imersare a mușchilor sartorius de broască produce o scădere semnificativă a conținutului în apă totală, respectiv acid piruvic, scăderea fiind proporțională în ambele cazuri cu creșterea concentrației de clorură de rubidiu. Rb^+ determină de asemenea o creștere a permeabilității membranei musculare. Scăderea concomitentă a acidului piruvic din mușchi cu creșterea permeabilității membranei musculare conduce la nivelarea valorilor acidului piruvic exosmozat din mușchiul tratat cu Rb^+ față de mușchiul simetric netratat.

Înlocuirea ionilor de potasiu cu cei de rubidiu în diverse țesuturi animale a format obiectul a numeroase cercetări. Astfel, Mitchell și colab. [1], perfuzînd mușchi de broască cu soluție Ringer în care clorura de potasiu a fost înlocuită cu o cantitate echimoleculară de clorură de rubidiu, observă pătrunderea Rb^+ în mușchiul excitat. Balingbroke și colab. [2] semnalează de asemenea înlocuirea gradată a K^+ la mușchiul sartorius de broască imersat într-o soluție de clorură de rubidiu, iar Lubin și Sneider [3], ținînd mușchi sartorius timp de o zi în soluție Ringer cu 5 mM clorură de rubidiu, constată că jumătate din K^+ este înlocuit cu Rb^+ și că după două zile de imersare în 10 mM clorură de rubidiu înlocuirea este aproape totală.

Se știe că Rb^+, ca și K^+, este transportat activ contra gradientului de concentrație [4] — [8]. Rb^+ injectat [9], [10] sau adăugat la hrana animalelor tinere [1], [7] conduce la înlocuirea unei cantități apreciabile de K^+ muscular cu Rb^+; mușchii roșii tind să acumuleze Rb^+ în cantitate mai mare decît cei albi [11].

Înlocuirea K^+ cu Rb^+ în organismele animale a fost demonstrată și pe alte țesuturi decît cel muscular [6], [8], [12] — [16].

Lubin și Sneider [3] au mai arătat că în unele condiții ionii de rubidiu au asupra celulei vii efecte asemănătoare cu cele ale K^+. Clorura de rubidiu, întocmai ca cea de potasiu, provoacă o creștere a ratei de căldură [17], iar descreșterea potențialului de repaus este asemănătoare efectului produs de K^+ [18], [19].

O serie de lucrări au cercetat influența Rb^+ asupra metabolismului muscular. S-a semnalat scăderea nivelului de creatinfosfat [20], creșterea respirației [21] și a necesității în calciu pentru sinereză a miofibrilelor [22], activarea piruvic fosfoferazei [23], a ATP-azei Mg-dependente [24] etc. În ultimii ani, studii extinse au fost consacrate influenței Rb^+ asupra reacțiilor enzimatice, evidențiindu-se rolul stimulator al acestuia asupra unei largi varietăți de enzime de diferite surse [25] — [34].

Rb^+, contrar K^+, nu modifică producerea de acid lactic la mușchii sartorius ai broaștelor rîioase [21]. Pe de altă parte însă, la organismele vegetale s-a semnalat rolul său în degradarea piruvatului [35], verigă intermediară importantă care leagă calea anaerobă de degradare de cea aerobă [36]. Dată fiind această contradicție, ni s-a părut interesantă urmărirea influenței ionului de rubidiu asupra conținutului și exosmozei acidului piruvic din mușchiul sartorius de broască.

Unele cercetări referitoare la variația conținutului în apă totală sub influența Rb^+ nu prezintă date concordante. Astfel, Briner și colab. [20] nu găsesc modificări de volum la mușchii sartorius de broască imersați în soluție Ringer cu Rb^+, în timp ce pe felii de cortex cerebral s-a semnalat o apreciabilă imbibiție la adaosul de Rb^+ în mediu [37].

Se impunea deci și în acest domeniu reluarea investigațiilor, cu atît mai mult cu cît modificări semnificative de volum necesitau aplicarea unui factor de corecție în evaluarea rezultatelor referitoare la acidul piruvic.

MATERIAL ȘI METODE

Experiențele au fost efectuate pe mușchi sartorius de broască (*Rana ridibunda*), cu măduva spinării distrusă cu două ore înainte de izolarea mușchilor. La izolarea mușchilor s-a avut grijă să se evite orice lezare. S-a lucrat pe cîte doi mușchi simetrici, proveniți de la două broaște. La martor, aceștia au fost imersați în 20 ml soluție Ringer-Jendrassik [38], conținînd la litru 6,5 g clorură de sodiu, 0,2 g clorură de calciu, 0,2 g clorură de potasiu și 0,1 g bicarbonat de sodiu. La variantele tratate, același volum de soluție Ringer-Jendrassik cu compoziția de mai sus conținea în locul K^+ un adaos de clorură de rubidiu, corespunzător concentrațiilor de 10, 20 sau 50 mM/l. Mușchii au fost imersați timp de $3\frac{1}{2}$ ore, sub barbotare continuă și uniformă cu 100% oxigen. La intervale de aproximativ 20 min, conținutul vasului de imersie se agita ușor. O dată cu introducerea în soluția Ringer cu Rb^+, toți mușchii se contractau, dar contractura trecea după cîteva minute.

Dată fiind cantitatea scăzută de acid piruvic dintr-un mușchi, determinările s-au efectuat pe cîte patru mușchi tratați identic. Mușchii au fost omogenizați la rece, într-un omogenizator Potter, cu 5 ml acid tricloracetic 10%, extractul tricloracetic fiind apoi centrifugat timp de 15 min la 4 500 rot/min. Pentru determinarea acidului piruvic, efectuată cu ajutorul metodei Friedeman și Haugen [39], modificată de Sacks și colab. [36], s-au folosit 3,5 ml extract. Dozarea s-a făcut după păstrarea extractului tricloracetic timp de 24 de ore la 4°C pentru evitarea interferen-

ței cu acidul oxalacetic [39]. Extracția cu xilen și carbonat de sodiu s-a realizat prin agitare mecanică timp de 3 min, faza de carbonat de sodiu centrifugîndu-se apoi timp de 15 min la 3 000 rot/min. Pentru dezvoltarea culorii s-a folosit hidroxidul de sodiu 4%. Citirile s-au efectuat după 15 min la 470 mμ, valorile raportîndu-se la o curbă de referință făcută pe piruvat de litiu în condiții identice. S-a determinat atît conținutul în acid piruvic al mușchiului, cît și cantitatea difuzată în soluția înconjurătoare pentru ca cele două valori însumate să reflecte cantitatea de acid piruvic produsă în timpul experienței. Rezultatele au fost exprimate în mg la 100 g mușchi cînd ne-am referit la conținutul mușchilor în acid piruvic, iar valorile pentru acidul piruvic exosmozat în cei 40 ml sînt exprimate în μg.

Pentru determinările de apă totală, mușchii au fost tratați în aceleași condiții, iar apa s-a determinat gravimetric, prin cîntăriri diferențiale, înainte și după uscare pînă la greutate constantă și s-a exprimat în ml/g de substanță uscată.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Înainte de a trece la determinările propriu-zise, am urmărit conținutul în apă totală al mușchilor imersați în soluție Ringer-Jendrassik fără adaos de clorură de rubidiu. Din tabela 1 se constată că mușchii simetrici conțin cantități aproape egale de apă liberă. Tabela 2 arată că și pentru acidul piruvic din mușchi și pentru cel exosmozat se obțin valori apropiate.

Tabela 1

Conținutul în apă totală al mușchilor sartorius simetrici de broască imersați în soluție Ringer-Jendrassik normală.

Mușchi sting = S; mușchi drept = D.

	Greutatea mușchilor g		Apă totală ml/g substanță uscată		Diferența ml/g substanță uscată
	D	S	D	S	
	0,30	0,28	3,70	3,72	0,02
	0,27	0,29	3,64	3,68	0,04
	0,30	0,30	3,95	4,00	0,05
	0,39	0,41	3,93	3,97	0,04
Media :	0,31	0,32	3,80	3,84	0,04

Dată fiind concordanța conținutului mușchilor în apă totală, respectiv în acid piruvic, ca și în ce privește cantitatea difuzată în soluția înconjurătoare, am trecut la urmărirea influenței celor trei concentrații de clorură de rubidiu.

Din datele trecute în tabela 3 se constată că mușchii tratați cu clorură de rubidiu în concentrații de 10, 20, respectiv 50 mM/l, conțin o cantitate de apă totală mai mică decît mușchii martor. Dehidratarea mușchilor este proporțională cu creșterea concentrației clorurii de rubidiu în mediul de imersare.

Tabela 2

Conținutul și exosmoza acidului piruvic la mușchii sartorius simetrici de broască imersați în soluție Ringer-Jendrassik normală.

Mușchi sting = S; mușchi drept = D.

	Greutatea mușchilor g		Acid piruvic în mușchi mg/100 g		Acid piruvic exosmozat μg		Acid piruvic produs în timpul experienței μg	
	D	S	D	S	D	S	D	S
	0,80	0,83	2,49	2,49	25	25	45	45
	0,91	0,92	2,80	3,11	30	28	55	56
	0,72	0,70	2,93	3,12	34	30	54	52
	0,73	0,74	3,20	3,41	26	27	47	48
Media :	0,79	0,80	2,85	3,03	29	28	50	50

Tabela 3

Conținutul în apă totală al mușchilor sartorius de broască imersați în soluție Ringer-Jendrassik cu adaos de RbCl.

Mușchi tratat cu RbCl = R; mușchi martor = M.

	Greutatea mușchilor g		Concentrația mM/l	Apă totală ml/g substanță uscată		Diferența ml/g substanță uscată
	M	R	M	M	R	
	0,28	0,28	10	4,05	4,01	0,04
	0,28	0,27	10	4,40	4,01	0,39
	0,18	0,17	10	3,71	3,54	0,17
	0,21	0,20	10	3,91	3,78	0,13
Media	0,24	0,23		4,02	3,83	0,18
	0,22	0,24	20	4,11	3,82	0,29
	0,27	0,28	20	3,89	3,32	0,57
	0,29	0,28	20	4,08	3,81	0,27
	0,19	0,20	20	4,21	4,18	0,03
Media	0,24	0,25		4,07	3,78	0,29
	0,25	0,24	50	3,88	3,44	0,44
	0,26	0,25	50	3,90	3,42	0,48
	0,20	0,21	50	3,92	3,57	0,35
	0,15	0,16	50	4,05	3,53	0,52
Media	0,21	0,21		3,94	3,49	0,45

Rezultatele noastre nu concordă cu cele ale lui Briner și colab. [20], care nu găsesc modificări de volum la mușchii sartorius de broască rîioasă imersați în soluție Ringer cu concentrații diferite de rubidiu. Ele sînt însă în acord cu datele publicate de o serie de alți cercetători [8], [40] — [44], după care cantitatea relativă a apei totale este determinată de compoziția mediului înconjurător.

Datele din tabela 4 arată că la mușchii tratați cu clorură de rubidiu în concentrație de 10, 20, respectiv 50 mM/l, cantitatea de acid piruvic scade semnificativ. Menționăm că în evaluarea rezultatelor am ținut

seama de scăderea în volum a mușchilor, corespunzătoare fiecărei concentrații de clorură de rubidiu. Cantitatea de acid piruvic care exosmozează însă nu este scăzută față de martor.

O serie de lucrări anterioare efectuate în institutul nostru [45] — [48] au scos în evidență faptul că, în ceea ce privește acidul fosforic liber din mușchiul gastrocnemian de broască, în anumite stări fiziologice există un paralelism strîns între conținutul și viteza exosmozei sale.

Deși cantitatea de acid piruvic este semnificativ scăzută în mușchi, valorile pentru acidul piruvic difuzat în mediul înconjurător sînt aproape egale cu cele ale mușchiului-martor (tabela 4).

Tabela 4

Conținutul și exosmoza acidului piruvic la mușchii sartorius de broască imersați în soluție Ringer-Jendrassik cu adaos de diferite concentrații de RbCl.

Mușchi tratat cu RbCl = R; mușchi martor = M.

	Greutatea mușchilor g		Concentrația RbCl mM/l	Acid piruvic în mușchi mg/100 g		Acid piruvic exosmozat μg		Acid piruvic produs în timpul experienței μg	
	M	R		M	R	M	R	M	R
	0,68	0,65	10	3,57	2,16	68	69	92	83
	0,64	0,63	10	4,74	3,08	24	22	55	42
	0,74	0,76	10	3,83	3,06	60	65	88	86
	0,65	0,66	10	3,20	2,50	60	63	86	82
Media	0,68	0,67		3,83	2,70	53	55	80	73
	0,59	0,57	20	4,00	2,00	44	48	65	58
	0,60	0,59	20	4,01	3,00	61	57	84	72
	0,65	0,63	20	4,06	2,66	42	50	68	57
	0,58	0,56	20	4,23	3,06	32	31	57	49
Media	0,60	0,59		4,07	2,68	45	46	68	59
	0,42	0,45	50	3,79	2,20	33	35	49	44
	0,64	0,62	50	2,54	1,26	25	22	41	30
	0,68	0,65	50	2,28	1,99	37	30	52	44
	0,50	0,53	50	4,97	3,00	34	34	52	46
Media	0,56	0,56		3,39	2,11	32	30	48	41

În lumina concluziilor lucrărilor sus-citate [45] — [48], rezultatele noastre pot fi explicate dacă ținem seama că, pe lîngă efectul de a micșora conținutul în acid piruvic al mușchiului, Rb^+ determină de asemenea o creștere a permeabilității membranei musculare. Manifestarea concomitentă a celor două efecte explică nivelarea valorilor acidului piruvic exosmozat din mușchiul tratat cu Rb^+ și din cel simetric, normal.

Deoarece răspunsul mușchilor la imersarea în cele trei concentrații de Rb^+ variază în intensitate, este dificil de precizat care concentrație este mai eficientă. De aceea, pentru a evidenția influența variației concentrației de Rb^+ asupra scăderii acidului piruvic, am comparat, într-o primă serie de determinări, efectul produs de 50 mM/l față de mușchiul simetric ținut în clorură de rubidiu 20 mM/l, iar în a doua serie un mușchi a fost imersat în clorură de rubidiu 20 mM/l și celălalt în clorură de rubidiu

Tabela 5

Conținutul și exosmoza acidului piruvic la mușchii sartorius simetrici de broască imersați în soluție Ringer-Jendrassik cu adaos de diferite concentrații de RbCl. Mușchi tratat cu 50,20,10mM/l RbCl = R_{50}, R_{20}, R_{10}.

	Greutatea mușchilor g		Acid piruvic în mușchi mg/100 g		Acid piruvic exosmozat μg		Acid piruvic produs în timpul experienței μg	
	R_{20}	R_{50}	R_{20}	R_{50}	R_{20}	R_{50}	R_{20}	R_{50}
	0,80	0,77	3,75	2,43	63	59	92	80
	0,62	0,64	2,66	1,85	80	76	96	87
Media	0,71	0,70	3,20	2,14	71	67	94	83
	R_{10}	R_{20}	R_{10}	R_{20}	R_{10}	R_{20}	R_{10}	R_{20}
	0,67	0,65	3,80	2,90	45	48	60	53
	0,55	0,52	4,00	3,10	35	32	58	52
Media	0,61	0,58	3,90	3,00	40	40	59	52

10 mM/l. După cum reiese din tabela 5, cele trei concentrații produc o scădere a acidului piruvic în ordinea următoare :

$$RbCl\ 50 > 20 > 10\ mM/l.$$

CONCLUZII

1. Ionul de rubidiu determină o scădere semnificativă a conținutului în apă totală din mușchiul sartorius de broască, care este proporțională cu creșterea concentrației de clorură de rubidiu.

2. Ionul de rubidiu produce și o scădere semnificativă a conținutului în acid piruvic al mușchiului sartorius de broască, scădere care este și în acest caz proporțională cu creșterea concentrației de clorură de rubidiu.

3. Pe lîngă acțiunea sa de diminuare a acidului piruvic, Rb^+ mărește permeabilitatea membranei musculare. Manifestarea concomitentă a acestor două efecte conduce la nivelarea valorilor acidului piruvic exosmozat din mușchiul tratat cu Rb^+ și din cel simetric netratat.

Datele noastre sînt în concordanță cu cele obținute pe organismele vegetale [35], după care Rb^+ are un rol în descompunerea piruvatului.

Calea prin care Rb^+ produce scăderea acidului piruvic rămîne să fie elucidată în viitor.

Prezentat la redacție la 15 aprilie 1971

Institutul de biochimie,
București

BIBLIOGRAFIE

1. P. H. Mitchell, J. W. Wilson, J. Gen. Physiol., **4**, 45 (1921).
2. E. Balingbroke, E. J. Harris, R. A. Sjodin, J. Physiol. London, **157**, 289 (1961).
3. M. Lubin, P. Sneider, J. Physiol., **138**, 140 (1967).
4. W. Graban, Invest. Radiol., **1**, 445 (1966).
5. P. Mennozzi, D. Norman, A. Palter, G. Lesler, O. Hechter, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., **45**, 80 (1959).
6. I. B. Kahn, Jr., J. Pharmacol. Expt. Terap., **136**, 197 (1962).
7. A. S. Relman, A. T. Lambie, A. Belton, J. Clin. Invest., **36**, 1249 (1957).
8. E. Cotlier, B. Kwan, C. Beaty, Biochim. Biophys. Acta, **150**, 705 (1968).
9. L. B. Mendel, D. E. Chasson, Am. J. Physiol., **16**, 152 (1906).
10. A. S. Kunin, E. H. Deabrin, A. S. Relman, Am. J. Physiol., **197**, 231 (1959).
11. F. A. Sreter, G. Woo, Am. J. Physiol., **205**, 1290 (1963).
12. U. V. Lassen, Biochim. Biophys. Acta, **94**, 1423 (1965).
13. W. O. Beradt, E. C. Beechwood, Am. J. Physiol., **208**, 642 (1965).
14. A. S. Relman, Jale J. Biol. Med., **29**, 248 (1956).
15. T. R. Riggs, L. M. Walker, H. N. Christensen, J. Biol. Chem., **233**, 1479 (1958).
16. H. Kleizeller, Nature, **180**, 24 (1957).
17. A. Solandt, J. Physiol., **86**, 162 (1936).
18. A. V. Hill, J. V. Howarth, Proc. Roy. Soc. London B, **147**, 21 (1957).
19. I. Adriani, Am. Med. Expt. Biol. Fernae, **34**, 26 (1956).
20. G. P. Briner, S. E. Simon, R. Frater, P. Tasker, Biochim. Biophys. Acta, **35**, 488 (1959).
21. M. Muller, S. E. Simon, Biochim. Biophys. Acta, **37**, 107 (1960).
22. K. S. Lee, K. Tonako, D. H. Yu, J. Physiol. London, **179**, 456 (1965).
23. F. Kahmar, P. D. Boyer, J. Biol. Chem., **200**, 669 (1953).
24. I. C. Fratantoni, A. Askari, Biochim. Biophys. Acta, **99**, 259 (1965).
25. A. Askari, Nature, **202**, 185 (1964).
26. M. N. Liubova, E. S. Meltina, Compt. Rend. Acad. Sci., URSS, **94**, 927 (1954).
27. E. E. Walwich, R. K. Main, Biochim. Biophys. Acta, **61**, 876 (1962).
28. R. W. Van Korpf, J. Biol. Chem., **203**, 265 (1953).
29. L. T. Webster, Jr., J. Biol. Chem., **241**, 5504 (1966).
30. R. H. Himes, T. Wildar, Biochim. Biophys. Acta, **99**, 464 (1965).
31. S. Black, Arch. Biochem. Biophys., **34**, 86 (1951).
32. R. Rodnight, B. E. Levin, Biochem. J., **88**, 17 (1963).
33. R. E. Nitsos, H. J. Evans, Plant. Physiol., **41**, 1499 (1966).
34. J. C. Webster, Biochim. Biophys. Acta, **20**, 265 (1956).
35. K. Nakamigova, A. O. Konda, Nippon, Doja Hiryogaku Zasshi, **31**, 485 (1960).
36. I. Sacks, R. C. Ganslen, J. T. Diffée, Am. J. Physiol., **177**, 143 (1954).
37. R. Rybova, J. Neurochem., **4**, 304 (1959).
38. L. Jendrassik, L. Faiszt, Rolando, Eötvos nominatae, Sect. Biol., **1**, 133 (1957).
39. T. E. Friedeman, G. E. Haugen, J. Biol. Chem., **147**, 415 (1943).
40. I. A. Karcley, E. J. Hamberg, K. White, Biochem. J., **80**, 9 P (1961).
41. A. Kleizeller, J. Nadvitkova, A. Knotkova, Biochem. Biophys. Acta, **135**, 286 (1967).
42. Yu. V. Natschin, Zn. Obsch. Biol., **27**, 473 (1966).
43. I. J. Bellows, E. Chinn, Am. J. Ophtalmol., **24**, 979 (1941).
44. W. N. Mc.Ferland, Publ. Inst. Mar. Sci., **10**, 179 (1965).
45. T. Rădulescu, D. Cotariu, L. Scolnic, Rev. roum. Biochim., **1**, 84 (1964).
46. T. Rădulescu, L. Scolnic, Rev. roum. Biochim., **1**, 191 (1964).
47. T. Rădulescu, D. Cotariu, Rev. roum. Biochim., **1**, 197 (1964).
48. L. Scolnic, St. cerc. biochim., **12**, 92 (1969).

THE EFFECT OF RUBIDIUM IONS UPON PYRUVIC ACID AND TOTAL WATER CONTENT AS WELL AS UPON PYRUVIC ACID EXOSMOSIS FROM FROG SARTORIUS MUSCLES

SUMMARY

Rubidium ions introduced in the immersion medium of frog sartorius muscles induce a significant decrease in total water and pyruvic acid content; this decrease is in both cases proportional to the increase in rubidium chloride concentration. Rb^+ also produces an increase in the permeability of muscle membrane. The decrease in muscle pyruvic acid is concomitant with the increase in muscular membrane permeability; for this reason, values of pyruvic acid diffused from Rb^+ treated muscles are similar to those found in the symmetrical non-treated one.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 3, 327–332 (1971)

EFECTUL ADMINISTRĂRII DE ESTROGEN ASUPRA LACTAT DEHIDROGENAZEI HEPATICE ŞI SERICE, PRECUM ŞI ASUPRA IZOENZIMELOR SALE ÎN INTOXICAŢIA CRONICĂ EXPERIMENTALĂ CU TETRACLORURĂ DE CARBON

MIHAIL ŞERBAN şi MARIANA STAN

Rezumat. — S-a cercetat efectul administrării de hormon estrogen asupra activităţii lactat dehidrogenazei şi a izoenzimelor sale în intoxicaţia hepatică cronică cu tetraclorură de carbon. Administrarea de estrogen determină o creştere semnificativă a activităţii lactat dehidrogenazei hepatice, activitate depresată de acţiunea agentului toxic. Modelul izoenzimelor lactat dehidrogenazei şi raportul H/M din ţesutul hepatic şi din ser nu se modifică în intoxicaţia hepatică cronică sub acţiunea hormonului estrogen. Administrarea hormonului în doze mici pare să acţioneze în sensul stimulării sintezei proteice.

Într-o lucrare anterioară [1] a fost descris efectul castrării şi administrării de estrogeni asupra necrozei, încărcării grase şi activităţii unor enzime hepatice în cursul intoxicaţiei cu tetraclorură de carbon. Deşi datele referitoare la relaţia dintre hormonii estrogeni şi ficat comportă unele contradicţii, o serie de cercetări experimentale evidenţiază efectul protector şi lipotrop al dozelor mici de estrogeni în afecţiunile hepatice, tratamentul cu doze mari exercitînd, dimpotrivă, un efect agravant [2], [3], [4].

Rezultatele obţinute de noi, care subliniază acţiunea protectoare (lipotropă şi antinecrozantă) a administrării de hormoni estrogeni, ne-au condus la reluarea experienţelor, de această dată însă pe un model experimental cronic. Am păstrat ca indicator biochimic în explorarea ficatului cercetarea activităţii lactat dehidrogenazei (LDH), ca reflectare a alterării metabolismului energetic glicolitic. Cum activitatea totală LDH în ficatul şobolanilor intoxicaţi acut cu tetraclorură de carbon şi trataţi cu estrogeni indică o modificare semnificativă în raport cu lotul-martor [1], ne-am propus să urmărim totodată şi comportarea modelului izoenzimatic al acestei enzime, model care poate furniza indicaţii mai complete asupra proceselor adaptative ale metabolismului celular alterat.

MATERIAL ŞI METODE

Experienţele s-au efectuat pe un număr de 30 de şobolani albi (femele) în greutate medie de 200 g, împărţiţi în trei loturi.

La un prim lot s-a realizat o intoxicaţie cronică hepatică prin administrare de tetraclorură de carbon, soluţie 50% în ulei de floarea-soarelui, cîte 0,2 ml/100 g corp, sub formă de injecţie intraperitoneală la 2—3 zile (în total 23 de injecţii). Celui de-al doilea lot i s-a aplicat un tratament identic, după care şobolanilor respectivi li s-a administrat cîte 1 mg undecilat de estradiol (Estrolent „CIF") la două săptămîni, în total 6 mg. În sfîrşit, celui de-al treilea lot, de referinţă, i s-a administrat în acelaşi ritm numai ulei de floarea-soarelui, cîte 0,2 ml/100 g corp.

Animalele au fost sacrificate, prin decapitare, la 24 de ore după ultima injecţie. Omogenatele de ficat s-au obţinut într-un omogenizator tip Potter, extracţia proteinenzimelor făcîndu-se în apă distilată; raportul de extracţie a fost de o parte greutate ţesut şi cinci părţi extractant. Omogenatele astfel obţinute au fost lăsate timp de 2 ore la +4°C, apoi centrifugate la 15 000 × g (+4°C) timp de 30 min. Supernatantele respective au fost utilizate pentru determinările enzimatice şi electroforetice. Concentraţia proteică, determinată prin metoda biuretului modificată pentru concentraţii mici [5], a variat între 1,70 şi 2,50 g/100 ml extract.

Activitatea enzimatică totală a lactat dehidrogenazei hepatice şi serice a fost determinată spectrofotometric, urmărind oxidarea $NADH_2$ la $\lambda = 340$ mμ în condiţiile descrise anterior [6]. În cazul ficatului, unităţile enzimatice au fost raportate la 1 mg ţesut umed; ele nu au fost exprimate ca activitate specifică, deoarece atît tetraclorura de carbon, cît şi hormonii influenţează marcant nu numai concentraţia proteinenzimelor, ci şi pe a altor componente proteice (lipoproteine), precum şi volumul ficatului.

Analiza electroforetică pentru punerea în evidenţă a izoenzimelor LDH hepatice şi serice s-a efectuat în gel de agar (0,8%), utilizînd tamponul veronal sodic—HCl de pH = 8,6 şi $\mu = 0{,}05$. Migrarea s-a realizat sub o tensiune de 10 V/cm, cu o intensitate de 3 mA/cm timp de 50 min la +8°C.

Vizualizarea izoenzimelor LDH s-a efectuat după tehnica imersiei, descrisă de Van der Helm [7] şi modificată de Knedel [8]. Evaluarea cantitativă a tipurilor de izoenzime LDH şi calcularea raportului H/M s-au efectuat prin prelucrarea datelor densitometrice şi planimetrice.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din datele experimentale obţinute se constată că în lezarea hepatică cronică efectul administrării de estrogen se manifestă printr-o creştere semnificativă a activităţii LDH totale din ficat, a cărei valoare este puternic diminuată în intoxicaţia cu tetraclorură de carbon.

După cum rezultă din tabela 1, intoxicația hepatică cronică determină o scădere evidentă, statistic asigurată, a activității LDH totale din ficat în raport cu lotul de referință. Faptul acesta ar putea fi atribuit atît lezării membranelor celulare sub acțiunea toxicului [9], [10], cît și unor alterări biochimice produse de acesta, ca, de exemplu, inhibarea sintezei proteice [11]. Lezarea membranelor, respectiv perturbarea proceselor de permeabilitate, ar trebui să conducă implicit la o deversare a enzimei în torentul

Tabela 1

Efectul hormonului estrogen (estrolent) asupra activității lactat dehidrogenazei hepatice și serice în intoxicația cronică experimentală (cifrele reprezintă media a 10 determinări)

Loturi de experiență	Activitatea totală LDH	
	u/ml ser	u/mg țesut umed
	Ser	Ficat
Lot martor	888± 94	151±17
Lot intoxicat cronic cu Cl_4C	1039±159	74± 7
Lot intoxicat cronic cu Cl_4C și tratat cu estrolent	1672±143	267±13

circulator. Cum însă activitatea LDH totale nu este semnificativ crescută în serul șobolanilor cu intoxicație hepatică cronică (tabela 1), pare mai probabilă acțiunea inhibitoare a tetraclorurii de carbon asupra sintezei enzimatice la nivelul reticulului endoplasmatic [12].

Pe de altă parte, creșterea activității LDH totale, constatată în ficatul animalelor intoxicate și tratate cu estrogen, s-ar putea explica prin acțiunea stimulantă pe care hormonul o exercită asupra sintezei proteice [12], [13]. În acest sens s-ar explica și faptul, aparent paradoxal, al creșterii activității LDH serice în condițiile relativei ameliorări a stării funcționale hepatice. O dată cu stimularea sintezei proteinenzimei în hepatocit are loc și o anumită pierdere a ei, permisă în continuare, pe durata unei permeabilități celulare încă insuficient corectate [14].

În ceea ce privește posibilitățile adaptative ale metabolismului energetic celular urmărit prin comportarea modelului izoenzimelor LDH sub acțiunea hormonului estrogen în intoxicația cronică hepatică, se observă (fig. 1) că repartiția activității între cele cinci izoenzime nu diferă de cea observată la lotul de șobolani intoxicați și netratați. Din acest punct de vedere se remarcă o analogie cu efectul manifestat de către un alt tip de hormon, pe care l-am cercetat anterior în aceleași condiții experimentale, și anume cortizolul [15]. Faptul că administrarea de estrogen redresează sau chiar mărește valoarea activității totale a enzimei în celula hepatică, fără să determine însă și o normalizare a modelului izoenzimelor LDH, se poate explica în sensul că, deși hormonul participă la stimularea sintezei proteice, el nu intervine în restabilirea profilului

energetic reflectat de către distribuţia caracteristică a activităţii izoenzimelor LDH. Ca o consecinţă a acestui fapt, şi modelul izoenzimelor LDH din ser rămîne practic similar cu cel din ţesutul hepatic al lotului intoxicat şi tratat cu estrogen, ceea ce reflectă, în continuare, o alterare a metabolismului energetic glicolitic la nivelul ficatului (fig. 1).

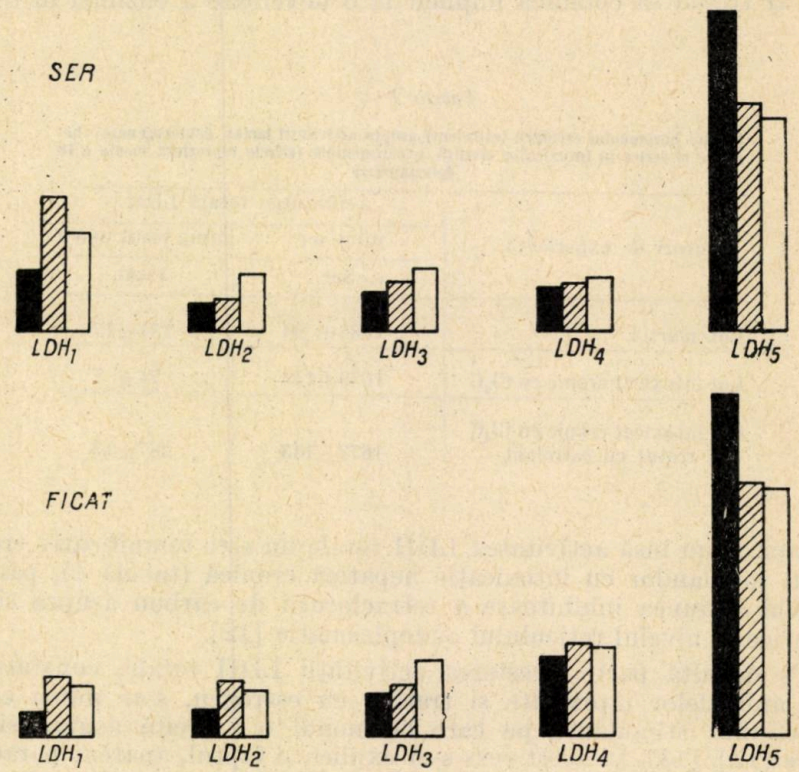


Fig. 1. — Repartiţia procentuală medie a izoenzimelor lactat dehidrogenazei din ficat şi ser în intoxicaţia experimentală cronică şi sub acţiunea hormonului estrogen (estrolent).

■ Lot de referinţă; ▨ lot intoxicat cu tetraclorură de carbon; ⊡ lot intoxicat cu tetraclorură de carbon şi tratat cu hormon estrogen.

Constatările menţionate referitoare la modelele izoenzimatice LDH din ficat şi ser se corelează şi cu valorile raportului H/M. După cum rezultă din figura 2, acest raport prezintă în ţesutul hepatic, ca şi în ser, valori mai crescute comparativ cu cele ale lotului de referinţă, atît în intoxicaţia cu tetraclorură de carbon, cît şi după administrarea hormonului estrogen; pe de altă parte, se observă că efectul hormonului nu se manifestă, cel puţin pe durata experienţei, asupra modificării acestui raport în comparaţie cu lotul intoxicat; în ambele cazuri, raportul H/M rămîne practic identic.

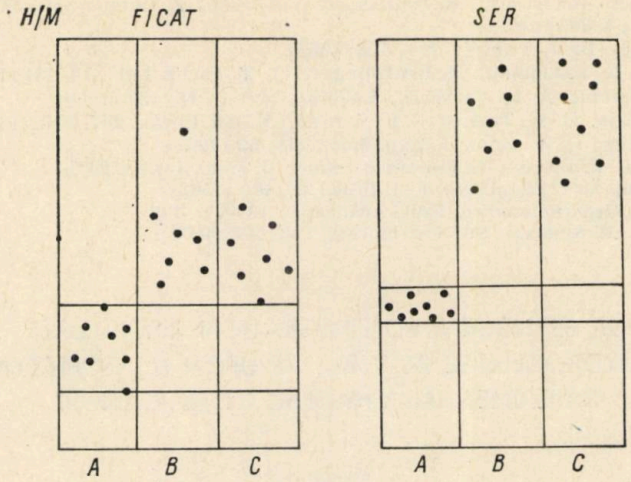


Fig. 2. — Raportul izoenzimelor H/M din ficat și ser. *A* — Lot de referință; *B* — lot intoxicat cu tetraclorură de carbon; *C* — lot intoxicat cu tetraclorură de carbon și tratat cu hormon estrogen.

CONCLUZII

Efectul administrării de estrogen în intoxicația hepatică experimentală cronică se manifestă printr-o creștere a activității lactat dehidrogenazei, activitate depresată de acțiunea tetraclorurii de carbon. Hormonul determină totodată și o creștere a activității serice a enzimei.

Modelul izoenzimelor lactat dehidrogenazei și raportul H/M din țesutul hepatic și ser nu sînt modificate în intoxicația cronică experimentală sub acțiunea hormonului estrogen.

Hormonul estrogen administrat în doze mici în intoxicația hepatică cronică acționează, probabil, mai degrabă asupra stimulării sintezei proteinenzimei decît asupra membranelor celulare alterate de către agentul toxic.

Prezentat la redacție la 4 octombrie 1970

Institutul de biochimie, București

BIBLIOGRAFIE

1. M. Stan, C. Vlădescu, S. Radu, M. Zamfirescu-Gheorghiu, St. cerc. med. int., **8**, 443 (1967),
2. G. Brenner, W. Korte, Endokrinologie, **42**, 212 (1962).
3. W. A. Jones, R. B. Cohen, Amer. J. Pathol., **42**, 237 (1963).
4. W. Korte, G. Brenner, Endokrinologie, **45**, 253 (1963).
5. H. L. Rosenthal, H. I. Cundiff, în *Clinical chemistry. Theory and Practice*, Raymond S. and Wilkinson J. H. (eds), Academic Press, New York — Londra, 1969, p. 341.

— c. 24 97

6. M. ZAMFIRESCU-GHEORGHIU, M. ȘERBAN, C. VLĂDESCU, Z. CHIRULESCU, Rev. Roum. Med. int., **4**, 395 (1967).
7. H. I. (van der) HELM, Lancet, *7193*, 108 (1961).
8. M. KNEDEL, K. EBERHARD, H. KIRZEDER, G. J. T. Fachz. Lab., **10**, 631 (1966).
9. R. O. RECKNAGEL, A. K. GHCSHAL, Laborat. Invest., **15**, 132 (1966).
10. E. S. REYNOLDS, R. W. THIERS, B. L. VALLEE, J. Biol. Chem., **237**, 3546 (1962).
11. E. A. SMUKLER, O. A. ISERI, J. Exp. Med., **116**, 55 (1962).
12. M. SELIGNAM, F. DANON, C. MIHAESCO, Amer. J. Med., **1**, 66 (1967).
13. N. I. HIROSHI, G. C. MUELLER, Fed. Proc., **22**, 409 (1963).
14. O. FODOR, în *Hepatita cronică*, Edit. Academiei, 1970, p. 226.
15. M. ȘERBAN, M. ȘERBAN., St. cerc. biochim., **14**, 203 (1971).

THE EFFECT OF ESTROGEN ADMINISTRATION UPON LIVER AND SERUM LACTATE DEHYDROGENASE AS WELL AS UPON ITS ISOENZYMES DURING EXPERIMENTAL CHRONIC INTOXICATION

SUMMARY

The effect of estrogen administration was studied on the activity of lactate dehydrogenase and its isoenzymes during chronic intoxication with carbon tetrachloride. Estrogen administration induces a significant increase in liver lactate dehydrogenase activity which was depressed by the action of the toxic agent. Both lactate dehydrogenase isoenzyme pattern and H/M ratio in liver tissue and serum do not change during chronic liver intoxication under the action of estrogen. Hormone administration in small doses seems to stimulate protein synthesis.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 3, 333–338 (1971)

ACTIVITATEA LACTAT DEHIDROGENAZEI DIN MUȘCHII DE BROASCĂ PERFUZAȚI CU 2,4-DINITROFENOL ȘI STIMULAȚI ELECTRIC

DINU TĂNĂSESCU și CORNELIU MEDEȘAN

Rezumat. — S-a cercetat activitatea lactat dehidrogenazei din mușchii de broască perfuzați cu o soluție 0,1 mM de 2,4-dinitrofenol. S-a constatat că în urma perfuziei cu 2,4-dinitrofenol se produce o creștere a activității lactat dihidrogenazei cu 23% peste nivelul de bază al activității acestei enzime. Stimularea electrică produce o creștere și mai evidentă a activității lactat dehidrogenazei, creșterea avînd un maxim după stimulările de 30 secunde. Prin prelungirea duratei de stimulare la 1, 3 și mai ales 5 minute, activitatea LDH tinde spre valoarea inițială de bază.

Glicoliza constituie unul dintre cele mai studiate capitole ale biochimiei musculare, datorită rolului său dominant în metabolismul energetic.

În ultimul timp, pentru efectuarea acestor studii s-a recurs la utilizarea 2,4-dinitrofenolului (2,4-DNP), substanță a cărei acțiune se manifestă în mod complex, diversificat. Astfel au fost semnalate, printre altele, efectele sale asupra compușilor macroergici musculari [1] — [5], asupra enzimelor participante în aceste procese, ca ATP-aza [6], miokinaza și creatinkinaza [7], sau asupra unor enzime glicolitice, dintre care amintim piruvat dehidrogenaza [8] și fosforilaza *b* purificată din mușchii de iepure [9], [10] sau de broască [11].

Într-o lucrare recentă [12] am semnalat că perfuzia mușchilor cu 2,4-DNP determină o creștere deosebit de ridicată a nivelului acidului lactic din perfuzat și astfel am adus încă un argument care pledează în favoarea tezei că această substanță acționează direct asupra glicolizei. În încercarea de a elucida mecanismul acestei creșteri a acidului lactic am urmărit în aceeași lucrare efectul pe care perfuzarea mușchilor gastrocnemieni de broască cu o soluție ce conține 2,4-dinitrofenol îl are asupra activității fosforilazei, enzimă care, după cum se știe, este prima care participă la secvența de reacții ale glicolizei musculare.

În lucrarea de față prezentăm rezultatele unor cercetări similare privind activitatea ultimei enzime participante la aceeași secvență de reacții, și anume a lactat dehidrogenazei din mușchii perfuzați cu o soluție de 2,4-DNP în Ringer bicarbonat și stimulați electric.

MATERIALE ŞI METODE

S-a lucrat pe broaşte (*Rana ridibunda*) în greutate de 40—50 g, imobilizate prin distrugerea măduvei spinării cu 12 ore înainte de perfuzie.

Perfuzia muşchilor s-a făcut după tehnica lui Trendelenburg [13], [14], cu modificările descrise într-o lucrare anterioară [14]. S-a utilizat o soluţie Ringer-bicarbonat [15], [16], cu sau fără 0,1 mM 2,4-DNP, barbotată cu azot în tot cursul perfuziei.

Perfuziile s-au efectuat la 20°C, fie la unul din picioarele posterioare, celălalt constituind martorul neperfuzat (cu circulaţia oprită), fie simultan la ambele picioare.

După 30 min de perfuzie s-au tăiat repede ambele picioare, s-au izolat cu grijă muşchii gastrocnemieni, care s-au menţinut apoi 30 min în 20 ml din soluţia cu care au fost perfuzaţi, de asemenea barbotată cu azot.

Atunci cînd s-a efectuat stimularea electrică, muşchiul-martor a fost îngheţat în azot lichid, iar celălalt imediat după ultima contracţie. Stimularea electrică a fost făcută cu pulsuri rectangulare 2 mA la bornele aparatului, 5 impulsuri/s, 5 ms/impuls, 145 ms pauză între impulsuri, timp de 30 s, 1, 3 sau 5 min.

Activitatea lactat dehidrogenazei a fost determinată prin urmărirea modificării extincţiei NADH la 340 mμ [17]. S-a utilizat mediul de reacţie format din : tampon TRIS—HCl 0,1 M, pH 7,5, piruvat de sodiu $2{,}5 \cdot 10^{-4}$M, NADH $1{,}5 \cdot 10^{-4}$M şi omogenat avînd o concentraţie proteică de 0,55 mg în medie. Volumul total al mediului de reacţie a fost de 2 ml şi s-au efectuat citiri din minut în minut timp de 5 min. Activitatea lactat dehidrogenazei a fost exprimată în μmoli lactat format/min/mg proteină.

Proteinele s-au determinat spectrofotometric la 280 mμ.

Separarea electroforetică a izoenzimelor lactat dehidrogenazei s-a efectuat în gel de agaroză în tampon TRIS-glicocol, la pH = 8,5. Evidenţierea izoenzimelor s-a făcut după tehnica dată de Fine şi Costello [18], utilizînd nitro BT, fenazin metosulfat, NAD, tampon TRIS pH 7,5 şi lactat de litiu.

REZULTATE

În experienţe preliminare s-a cercetat dacă prin perfuzia cu Ringer-bicarbonat nu se produce o modificare a activităţii lactat dehidrogenazei, comparativ cu aceea din omogenatele muşchilor neperfuzaţi. Rezultatele fiind perfect superpozabile, s-a putut trece la efectuarea variantelor de cercetare propuse.

Rezultatele vor fi comentate în funcţie de efectele produse asupra activităţii lactat dehidrogenazei, de : a) perfuzia cu 2,4-dinitrofenol, comparativ cu perfuzia cu soluţie Ringer-bicarbonat ; b) stimularea electrică a muşchilor perfuzaţi.

Aşa după cum se poate vedea din figura 1, prin perfuzia muşchilor cu o soluţie Ringer-bicarbonat conţinînd 0,1 mM 2,4-DNP, are loc o creştere a nivelului de bază al activităţii LDH de la 2,91 μmoli lactat/min/mg proteină — nivel determinat la muşchii perfuzaţi numai cu soluţia Ringer — la 3,58 μmoli lactat/min/mg proteină. Aceasta reprezintă,

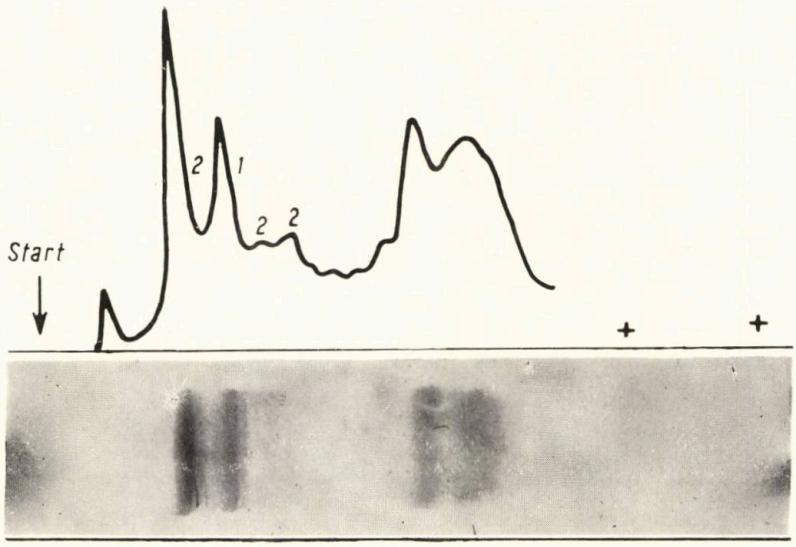


Fig. 4. — Electroforegrama acizilor nucleici din celulele hifale de *A. niger* şi curba ei densitometrică. Electroforeza în gel de agaroză 1,5% în tampon TRIS-acid citric, pH=7,9; colorare cu albastru de toluidină; cifrele care însoţesc curba indică existenţa uneia sau mai multor fracţiuni electroforetice de AN, care nu se evidenţiază bine în curbe, însă sînt vizibile pe electroforegrame.

în procente, o creștere de 23% a activității LDH. Pe acest fond crescut al activității LDH determinat de acțiunea 2,4-DNP, se va adăuga, așa cum vom vedea, și creșterea provocată de stimularea electrică a mușchilor.

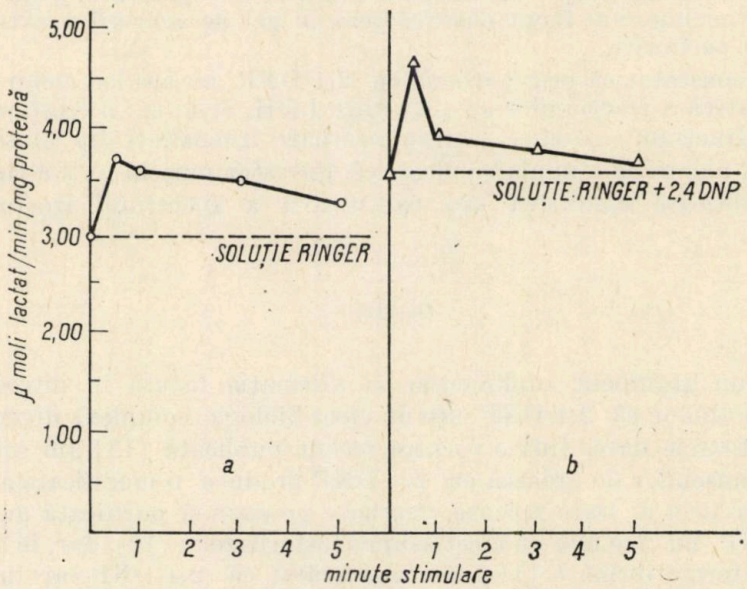


Fig.1. — Variația activității lactat dehidrogenazei în mușchii perfuzați cu : *a* — soluție Ringer ; *b* — soluție Ringer cu 0,1 mM 2,4-dinitrofenol și stimulați electric. Fiecare punct reprezintă media a 5 determinări. Activitatea lactat dehidrogenazei este exprimată în μ moli lactat format/min/mg proteină.

În urma stimulării electrice a mușchilor perfuzați fie numai cu soluție Ringer-bicarbonat, fie cu soluție Ringer-bicarbonat cu 2,4-DNP, se produce o creștere a activității lactat dehidrogenazei. Dar, în cele două variante experimentale, creșterea activității nu este identică nici din punct de vedere valoric și nici în ceea ce privește modul în care activitatea variază în funcție de timpul de stimulare. Astfel s-a constatat că în ambele cazuri activitatea maximă are loc după o stimulare electrică de 30 s, cu deosebirea că în cazul mușchilor perfuzați cu 2,4-DNP creșterea activității enzimei este de 53%, în timp ce în cazul mușchilor perfuzați numai cu soluție Ringer-bicarbonat ea este de numai 26%.

O dată cu prelungirea duratei de stimulare la 1, 3 și 5 min, activitatea lactat dehidrogenazei tinde spre nivelele de bază ; dar, în cele două variante experimentale, aceste răspunsuri sînt diferite din punct de vedere cantitativ. După cum se vede din figura 1, la mușchii perfuzați cu 2,4-DNP activitatea lactat dehidrogenazei revine mai rapid spre valoarea de bază după stimularea electrică a mușchilor timp de 1, 3 și mai ales după 5 min, cînd acest nivel de bază este aproape atins, în timp ce, în aceleași condiții,

la mușchii perfuzați cu soluție Ringer-bicarbonat se menține un fond mai ridicat al activității lactat dehidrogenazei, chiar și după stimulări îndelungate de 5 min.

Pentru a putea să apreciem dacă modificările cantitative ale activității LDH sînt însoțite de modificări simultane ale spectrului izoenzimatic al acestei enzime, am făcut electroforeza în gel de agaroză a extractului mușchilor perfuzați.

S-a constatat că prin perfuzia cu 2,4-DNP nu are loc nici o modificare calitativă a fracțiunilor cu activitate LDH, ci numai o creștere cantitativă a fracțiunii catodice, corespunzătoare izoenzimei tip mușchi. De asemenea, nici după stimularea electrică a acestor mușchi nu s-a constatat vreo modificare calitativă sau cantitativă a spectrului izoenzimatic.

DISCUȚII

Ca un argument suplimentar la afirmația făcută în introducerea lucrării, și anume că 2,4-DNP are un efect biologic complex, diversificat, vin următoarele date. Într-o lucrare recent publicată [12] am arătat că perfuzia mușchilor de broască cu 2,4-DNP produce o modificare a activității fosforilazei *a*. Date recente efectuate pe enzimă purificată au arătat că 2,4-DNP nu are nici un efect asupra fosforilazei *a* [10], dar, în schimb, inhibă puternic forma *b* [11]. S-a mai arătat că 2,4-DNP are un efect inhibitor de o mai mică amploare asupra creatinkinazei și miokinazei [7], dar în anumite condiții activează ATP-aza [6], că, în sfîrșit, așa după cum am arătat în datele prezentate aici, are un efect de activare asupra lactat dehidrogenazei.

Referitor la activitatea 2,4-DNP asupra izoenzimelor lactat dehidrogenazei purificate din mușchii de iepure, subliniem că numai izoenzima tip mușchi (M_4) este afectată de 2,4-DNP, în timp ce asupra izoenzimei H_4 această substanță nu are nici un efect [19].

Prin urmare, din toate aceste date se poate considera că 2,4-DNP acționează ca un efector biologic cu o adresă precisă și cu un efect bine determinat, în funcție de anumite caracteristici structurale ale moleculelor proteice. În acest context considerăm că este necesar să amintim că două dintre enzimele asupra cărora 2,4-DNP are efectele cele mai marcate, și anume fosforilaza și lactat dehidrogenaza — enzime situate la cele două extremități ale lanțului de reacții glicolitice —, sînt enzime cu rol de control asupra glicolizei și în același timp, atît fosforilaza *b*, cît și LDH izoenzima tip mușchi, și proteine cu caracteristici allosterice.

După părerea noastră, datele obținute în această lucrare și care dovedesc că perfuzia mușchilor cu o soluție Ringer-bicarbonat ce conținea 2,4-DNP se produce creșterea activității lactat dehidrogenazei explică unul din mecanismele prin care această substanță produce creșterea efluxului de acid lactic din perfuzat și implicit a glicolizei.

CONCLUZII

Perfuzia cu o soluție Ringer-bicarbonat a mușchilor de broască nu produce modificarea activității lactat dehidrogenazei comparativ cu aceea din omogenatele mușchilor neperfuzați.

După perfuzia mușchilor cu o soluție Ringer-bicarbonat conținînd 0,1 mM 2,4-DNP, se produce o creștere cu 23% peste nivelul de bază al activității lactat dehidrogenazei.

Stimularea electrică a mușchilor perfuzați determină o creștere maximă a activității enzimei după stimulări de 30 s.

Prelungirea duratei de stimulare la 1, 3 și 5 min face ca activitatea lactat dehidrogenazei să tindă spre nivelele de bază.

Prin separarea electroforetică în gel de agaroză a izoenzimelor lactat dehidrogenazei din mușchii perfuzați cu 2,4-DNP nu s-au constatat modificări calitative ale fracțiunilor cu activitate izoenzimatică, ci numai o creștere cantitativă a fracțiunii catodice (izoenzima tip mușchi). Stimularea electrică a acestor mușchi nu a produs modificări ale spectrului izoenzimatic.

Pe baza creșterii activității lactat dehidrogenazei este posibil să se explice creșterea glicolizei musculare, respectiv a efluxului lactatului, în cazul perfuziei mușchilor cu soluție Ringer-bicarbonat care conținea 2,4-DNP.

Prezentat la redacție la 31 martie 1971

Institutul de biochimie, București

BIBLIOGRAFIE

1. A. Fleckenstein, J. Janke, R. E. Davies, H. A. Krebs, Natur, **174**, 1081 (1954)
2. D. F. Cain, A. Infante, D. Klaupiks, W. A. Eaton, R. E. Davies, Fed. Proc., **21**, 319 (1962).
3. D. F. Cain, A. A. Infante, R. E. Davies, Nature, **196**, 214 (1962).
4. C. Medeșan, Rev. roum. Biochim., **3**, 363 (1966).
5. C. Medeșan, N. Moldoveanu, Rev. roum. Biochim., **6**, 43 (1969).
6. H. M. Levy, P. D. Leber, E. M. Ryan, J. Biol. Chem., **238**, 3654 (1963).
7. N. Moldoveanu, C. Medeșan, St. cerc. biochim., **13**, 399 (1970).
8. Y. M. Ostrovskii, L. Y. Makarina-Kibar, Dokl. Acad. Nauk, B, SSSR, **10** (3), 206 (1966).
9. A. A. Simoes, A. Focesi Jr., J. M. Goncalves, Experiencia, **25**, 71 (1969).
10. J. M. Goncalves, A. Focesi Jr., Nat. Cancer Inst. Mongr., **27**, 71 (1967).
11. D. Tănăsescu, N. Moldoveanu, Rev. roum., **7**, 313 (1970).
12. C. Medeșan, D. Tănăsescu, Rev. roum. Biochim., **7**, 215 (1970).
13. P. Trendelenburg, menționat de J. Gautrelet [14].
14. J. Gautrelet, *Éléments de technique physiologique*, Masson et C-ie, Paris, 1932, p. 355.
15. P. J. Boyle, J. Conway, J. Physiol., **100**, 1 (1941).
16. W. F. Mommaerts, K. Seraydarian, G. Marechal, Biochim. Biophys. Acta, **57**, 12 (1962),
17. A. Kornberg, în *Methods in enzymology*, et. S. P. Collowick, vol. III, N. O. Kaplan, Acad. Press., New York, 1957, p. 447.
18. I. H. Fine, L. A. Costello, *Methods in Enzymology*, vol. VI, 1963, p. 958.
19. D. Tănăsescu, N. Moldoveanu, C. Medeșan, Rev. roum. Biochim., **8** (1971).

LACTATE DEHYDROGENASE ACTIVITY IN FROG MUSCLES PERFUSED WITH 2,4-DINITROPHENOL AND ELECTRICALLY STIMULATED

ABSTRACT

The activity of lactate dehydrogenase in frog muscles perfused with 0·1 mM 2·4-dinitrophenol solution has been investigated.

Subsequent to 2·4-dinitrophenol perfusion there occurs an increase in the activity of lactate dehydrogenase by 23% beyond the basic level of the activity of this enzyme.

The electrical stimulation brings about an even more obvious increase in the activity of lactate dehidrogenase, with a maximum after the 30-second stimulations. By extension of the stimulation duration up to 1, 3 and especially 5 minutes the LDH activity tends to the initial basic value.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 3, 339–352 (1971)

ACIZII NUCLEICI DIN CELULELE HIFALE ŞI SPORII DE *ASPERGILLUS NIGER*

S. VASU şi SANDA RĂDULESCU

Rezumat. — În creşterea şi dezvoltarea miceliului de *A.niger*, în special într-o fază timpurie a creşterii şi în timpul formării sporilor, se produc modificări cantitative ale ADN şi ARN, a activităţii DN-azelor şi RN-azelor intra- şi extracelulare şi sînt eliberaţi, în fracţiunea acido-solubilă din miceliu şi în mediul de cultură, produşi care determină creşterea absorbţiei la 256 nm. S-au extras şi purificat cu fenol acizii nucleici din miceliul de diferite vîrste şi din sporii de *A.niger* şi s-au fracţionat prin electroforeză în gel de agaroză. Spectrul electroforetic al acizilor nucleici, extraşi din miceliu de diferite vîrste, devine mai eterogen o dată cu sporularea culturilor. Sporii, în fază latentă, conţin specii moleculare de AN asemănătoare în mare măsură cu ADN şi ARN-r din celulele hifale. Din spori par să lipsească ARN, care se extrag din miceliul nesporulat cu fenol la 65°C. ARN-s din spori este întrucîtva diferit faţă de ARN-s din celulele hifale, deoarece între aceştia există diferenţe de migrare electroforetică în gelul de agaroză.

Wake şi colab. [1], precum şi noi [2], [3], au arătat că în creşterea şi dezvoltarea fungului *A. niger* se produc modificări cantitative ale acizilor nucleici (AN), atît într-o fază timpurie a dezvoltării miceliului, cît şi în timpul formării conidioforului, respectiv cînd cultura sporulează. În timpul formării sporilor, Bajaj şi colab. [4] indică translocarea fosforului, iar Belozerski şi Kulaev [5], [6] a polifosfaţilor acido-solubili dinspre miceliu către spori. După Nishi [7], ^{32}P se acumulează în polifosfaţii şi fosfolipidele din spori, de unde în timpul germinării sporilor este vehiculat către nucleotide şi acizii ribonucleici (ARN), principalele substanţe în metabolizarea fosforului fiind glicerofosfatul şi adenozintrifosfatul. De fapt, în germinarea sporilor, după cum a arătat Yanagita [8], bazofilia citoplasmei se intensifică şi are loc o sinteză activă a AN, în special a ARN. După Hoshino şi colab. [9], sporii negerminaţi se deosebesc de cei germinaţi prin prezenţa AN în fază latentă, care devin activi şi duc la modificări moleculare, evidenţiate prin schimbarea raportului baze purinice — baze pirimidinice.

În lucrări anterioare, preocupîndu-se de cercetarea AN din *A. niger* [3], [10], [11], precum şi din unele ţesuturi vegetale [12] sau animale [13], a reieşit, printre altele, că fracţionarea electroforetică a AN în geluri de agaroză poate fi folosită cu succes atît pentru separarea acizilor dezoxiribonucleici (ADN) de ARN, cît şi pentru separarea diferitelor specii moleculare de ARN. Referindu-ne în acest sens la *A. niger*, am arătat, de exemplu, că ARN microzomali din celulele hifale [10] sînt întrucîtva diferiţi de ARN ribozomali (ARN-r) mitocondriali şi că, în general, ARN-r fracţionaţi

electroforetic în gel de agaroză sînt mult mai eterogeni decît s-a stabilit prin ultracentrifugare în gradient de zaharoză [14]. Recent, Edelman şi colab. [15], precum şi Verma şi colab. [16], au dovedit diferenţele care există între ARN-r mitocondriali şi omologii lor citoplasmatici în cazul fungului *A.nidulans*, prin măsurători electroforetice, compoziţia în baze şi secvenţa acestora, precum şi prin determinarea mărimii lor moleculare prin microscopie electronică.

Luînd în considerare cele de mai sus, ne-am propus să urmărim pe cale electroforetică AN din celulele hifale şi sporii de *A. niger*; să vedem dacă în timpul creşterii şi dezvoltării miceliului variaţiile cantitative ale AN nu sînt însoţite de modificări ale activităţii unor enzime, în special ale nucleazelor, şi, în fine, dacă în ele nu sînt implicate diferitele specii moleculare de AN.

MATERIAL ŞI METODE

A. niger ICA-34 era cultivat de mediul Raulin modificat, în condiţiile descrise anterior [17]. Miceliul de diferite vîrste, provenit din probe de cîte 50 ml mediu însămînţate cu 10^6 spori, separat de mediul de cultură, spălat de 2—3 ori cu apă rece şi uscat cu hîrtie de filtru, era prelucrat după cum urmează :

a) pentru dozarea AN, 1 g miceliu era omogenizat în omogenizator Potter-Elvehjem la rece în 5 ml NaCl 0,14 M şi EDTA—Na_2 0,1 M; AN din 3 ml omogenat erau precipitaţi cu 3 ml acid percloric (APC) 1 M, iar precipitatul separat prin centrifugare la rece era spălat de două ori cu APC 0,5 M. Supernatantele reunite, care conţineau substanţele din miceliu solubile în APC (fracţiunea acido-solubilă), erau aduse la 25 ml cu APC 0,5 M şi tratate V/V de două ori cu un amestec de cloroform-alcool izoamilic (24 : 1, V/V). După centrifugare, supernatantul era diluat 1 : 10 cu APC 0,5 M şi se determina densitatea optică la 256 nm (vezi spectrul de absorbţie al unei astfel de probe în figura 3). Precipitatul care conţinea AN era extras cu etanol 80% şi 95% (la temperatura camerei şi la 70°C), apoi cu eter etilic, iar după uscare la temperatura camerei era prelucrat după tehnica Ogur şi Rosen [18]. ADN se determina după Burton [19], iar ARN după metoda Moule [20];

b) pentru extracţia şi purificarea AN se lucra în condiţiile arătate într-o lucrare anterioară [10], AN fiind extraşi şi purificaţi în prezenţă de bentonită şi sodiu dodecilsulfat cu fenol-8-hidroxichinolină;

c) pentru urmărirea activităţii nucleazice, miceliul era omogenizat la rece în zaharoză 0,25 M şi centrifugat după 60 min la 3 000 rot/min timp de 10 min; în supernatant se determina activitatea nucleazelor;

d) pentru determinarea greutăţii uscate, miceliul era uscat timp de cel puţin 6 ore la 105°C.

Mediul de cultură şi apele de spălare a miceliului erau reunite; se aduceau la pH = 4 şi se diluau la 100 ml. Lichidul astfel obţinut era folosit :

a) pentru urmărirea activităţii nucleazelor extracelulare şi

b) pentru stabilirea densităţii optice la 256 nm; în prealabil, lichidul de cultură era tratat V/V, de două ori, cu un amestec de cloroform-

alcool izoamilic (24 : 1, V/V). După centrifugare, faza apoasă era diluată 1 : 4 cu APC 0,5 M şi se determina densitatea optică la 256 nm (vezi spectrul de absorbţie al unei astfel de probe în figura 3).

Sporii de *A. niger* erau obţinuţi pe mediu solidificat cu agar; erau recoltaţi prin agitarea culturilor cu apă distilată rece, filtrare prin pînză de nylon şi centrifugare la 5 000 rot/min timp de 15—20 min. Depozitul astfel obţinut, controlat la microscop, practic nu conţinea hife.

Tehnicile utilizate pentru dozarea, extracţia şi purificarea AN din spori erau similare celor folosite pentru miceliu, cu deosebirea că omogenizarea sporilor se efectua prin mojarare la rece, cu nisip de cuarţ sau vată de sticlă. Separarea unor formaţiuni subcelulare din spori, extracţia şi purificarea AN din acestea s-au efectuat ca şi în cazul celulelor hifale, după cum s-a arătat în alte lucrări [10], [11]. Extracţia şi purificarea AN cu fenol la diferite temperaturi se realiza în condiţiile date de Mach şi colab. [21].

Activitatea RN-azelor intra- şi extracelulare se determina şi se exprima în unităţi enzimatice, după indicaţiile date de Egami şi colab. [22]; ca substrat se folosea ARN din drojdie (British Drug House), iar sistemul de reacţie era tamponat cu acid citric 0,1 M —Na_2HPO_4 0,2 M. În general, activitatea RN-azelor la pH acid, pH = 4,5, era de circa două ori mai mare decît la pH alcalin.

În condiţii similare se urmărea şi se exprima activitatea DN-azelor; din amestecul de reacţie, în cazul DN-azelor lipsea EDTA, iar ca substrat se folosea ADN (ex hering sperm; Koch-Light). Activitatea DN-azelor la pH neutru, pH = 7,0, era mai mare decît la pH acid.

REZULTATE

În figura 1 redăm cantitatea de ADN , ARN şi greutatea miceliului uscat din culturile de *A. niger*.

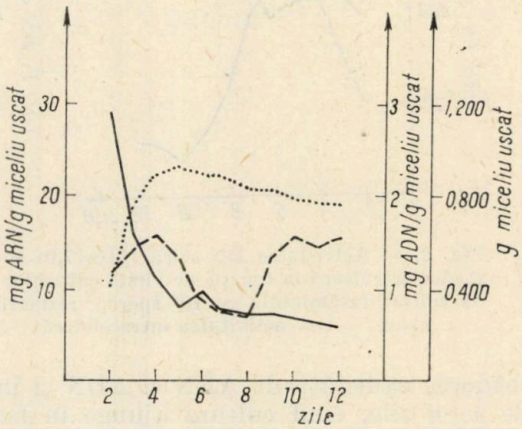


Fig. 1. — ADN, ARN şi greutatea miceliului uscat în funcţie de vîrsta culturilor de *A. niger*. Probe a 50 ml mediu de cultură însămînţate cu 10^6 spori; — — — ADN; ——— ARN; ..... greutatea miceliului uscat.

Rezultatele din figura 1 indică o metabolizare relativ intensă atît a ADN, cît şi a ARN în cursul creşterii şi dezvoltării miceliului de *A. niger*.

Cantitatea de ADN creşte în primele zile, urmînd curba de creştere a miceliului, scade o dată cu instalarea fazei staţionare de creştere, cînd în condiţiile noastre experimentale are loc sporularea masivă a culturilor, pentru ca ulterior să crească din nou şi să revină practic la valorile înregistrate iniţial. La rîndul ei, cantitatea de ARN este relativ mare în miceliul tînăr şi scade apoi continuu cu cît vîrsta culturilor creşte. Cu toată această scădere continuă a cantităţii de ARN şi creştere a cantităţii de ADN, în anumite faze de dezvoltare a miceliului raportul ARN/ADN este net în favoarea ARN. Miceliul conţine o cantitate relativ mare de ARN (de ordinul zecilor de mg/g miceliu uscat) şi una mică de ADN (de ordinul mg/g miceliu uscat). Acelaşi raport favorabil pentru ARN l-am găsit şi în sporii de *A. niger* [11], cu toate că în spori, faţă de miceliu, are loc o concentrare a ADN.

În legătură cu variaţiile cantitative ale AN din miceliul de *A.niger* de diferite vîrste, am urmărit, pe de o parte, activitatea nucleazelor intra- şi extracelulare şi, pe de altă parte, absorbţia în ultraviolet a fracţiunilor acido-solubile, rezultate din prelucrarea miceliului în vederea dozării AN, şi a mediilor de cultură.

Figura 2 arată activitatea RN-azică la pH = 4,5 şi cea DN-azică la pH = 7,0 din miceliu şi din mediul de cultură în funcţie de vîrsta culturilor. Rezultă din figura 2 că modificarea activităţii RN-azice şi DN-azice corespunde, în general, variaţiilor cantitative ale ARN şi ADN, constatate în creşterea şi dezvoltarea miceliului de *A.niger*. Astfel, de exemplu, activitatea RN-azică şi DN-azică din miceliu creşte o dată cu

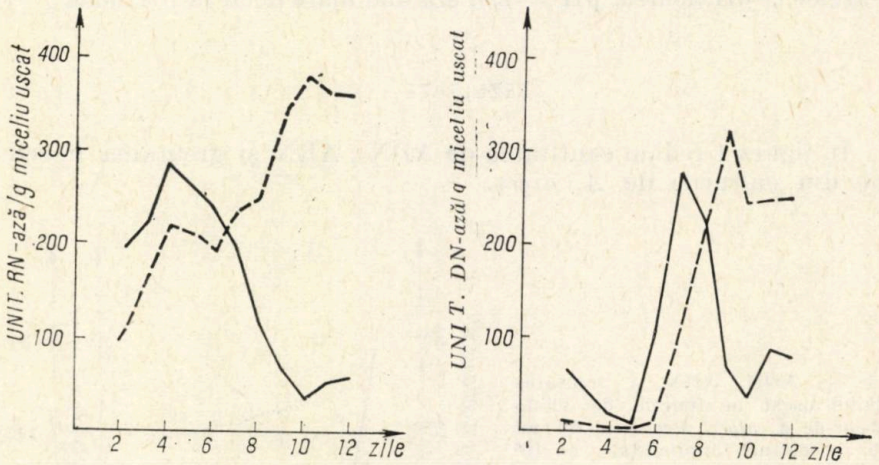


Fig. 2. — Activitatea DN-azică (pH=7,0) şi RN-azică (pH=4,5) din miceliu şi mediu de cultură în funcţie de vîrsta culturilor de *A. niger*. Probe a 50 ml de mediu de cultură însămînţate cu 10^6 spori; rezultate în unităţi enzimatice/g miceliu uscat; —— activitatea intracelulară; — — — activitatea extracelulară.

scăderea cantităţii de ARN şi ADN şi înregistrează un maxim în miceliul de 4—6 zile, cînd cultura ajunge în faza staţionară de creştere şi cînd conidioforul este bine dezvoltat. Ulterior, activitatea celor două enzime din miceliu începe să scadă, remarcîndu-se însă o creştere a activităţii lor în lichidul de cultură.

Variaţiile cantitative ale AN şi ale activităţii nucleazelor sînt reflectate şi prin rezultatele din figura 3, care, pe lîngă cîte un spectru de absorbţie în ultraviolet pentru fracţiunea acido-solubilă din miceliu şi pentru mediul de cultură, cuprinde modificarea absorbţiei la 256 nm a probelor respective în funcţie de vîrsta miceliului de *A. niger*.

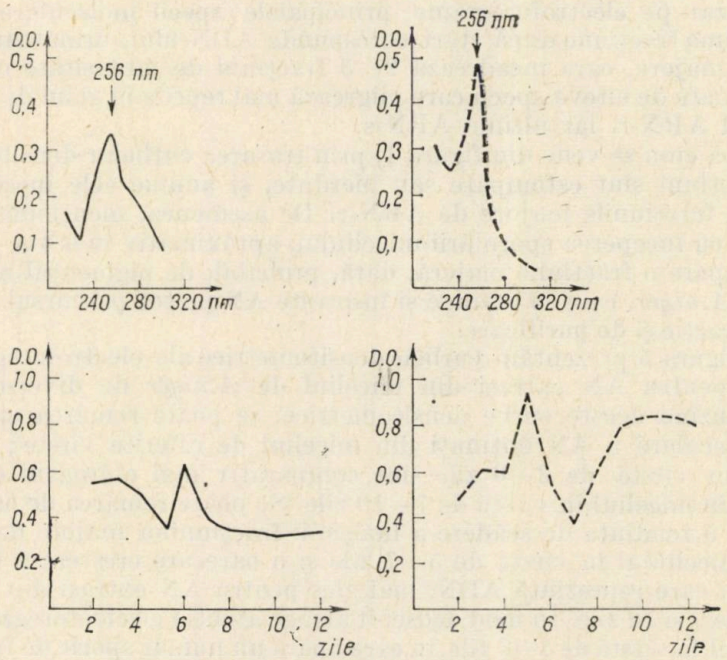


Fig. 3. — Spectrul de absorbţie în ultraviolet şi densitatea optică la 256 nm a fracţiunii acido-solubile din miceliu şi a mediului de cultură în funcţie de vîrsta culturilor de *A. niger*. Probe a 50 ml mediu de cultură însămînţate cu 10^6 spori; ——— fracţiunea acido-solubilă din miceliu şi ..... mediu de cultură, tratate cu cloroform — alcool izoamilic 24 : 1.

După cum se vede din figura 3, probele menţionate prezintă spectre de absorbţie asemănătoare, cu un maxim la 256 nm. Aceste spectre de absorbţie sînt în mare măsură similare celor care se obţin pentru AN sau produşii lor de metabolizare. Urmărind absorbţia la 256 nm în funcţie de vîrsta culturilor, se vede că în cazul fracţiunii acido-solubile din miceliu se înregistrează o scădere în primele 5 zile, cînd în mediul de cultură substanţele care absorb la 256 nm cresc, dînd un maxim. În faza staţionară de creştere, cînd cultura sporulează, absorbţia la 256 nm scade atît în miceliu, cît şi în mediul de cultură, pentru ca ulterior să se menţină practic constantă în miceliu şi să crească în mediul de cultură.

Pentru a stabili dacă în variaţiile cantitative ale AN constatate în cursul creşterii şi dezvoltării miceliului de *A. niger* sînt implicate anumite specii moleculare de ARN şi ADN, am recurs la fracţionarea AN prin electroforeză în gel de agaroză.

În figura 4 redăm electroforegrama unui preparat de AN şi curba ei densitometrică.

După cum am arătat într-o altă lucrare [10], folosind diferite tehnici de separare a unor specii moleculare de ARN, extrăgînd AN din diferite formaţiuni subcelulare izolate din celulele hifale de *A. niger* şi tratînd AN astfel obţinuţi cu RN-ază sau DN-ază, înainte sau după electroforeză, am localizat pe electroforegrame principalele specii moleculare de AN. Astfel, prima fracţiune după start corespunde ADN-ului, următoarele două fracţiuni majore, care încadrează 2—3 fracţiuni de intensitate mai mică şi sînt urmate de cîteva specii care migrează mai repede în gelul de agaroză, corespund ARN-r, iar ultima ARN-s.

După cum se vede din figura 4, prin trasarea curbelor densitometrice unele fracţiuni sînt estompate sau pierdute, şi anume cele încadrate de obicei, de fracţiunile majore de ARN-r. De asemenea, menţionăm faptul că o dată cu începerea sporulării miceliului, aproximativ în a 4-a — 5-a zi, pe start apare o fracţiune majoră, dată, probabil, de pigmentul negru din sporii de *A.niger*, care se extrage şi însoţeşte AN pe tot parcursul procesului de extracţie şi de purificare.

În figura 5 prezentăm curbele densitometrice ale electroforegramelor obţinute pentru AN extraşi din miceliul de *A.niger* de diverse vîrste.

Analizînd aceste curbe densitometrice, se poate remarca eterogenitatea moleculară a AN obţinuţi din miceliul de diferite vîrste; AN din miceliul în vîrstă de 2—6 zile sînt comparativ mai eterogeni decît cei obţinuţi din miceliul în vîrstă de 7—10 zile. Se poate remarca de asemenea din figura 5 tendinţa de scădere a înălţimii fracţiunilor majore de ARN-r în cazul miceliului în vîrstă de 5—7 zile şi o oarecare creştere a înălţimii maximului care reprezintă ADN, mai ales pentru AN extraşi din miceliul în vîrstă de 9 şi 10 zile. În mod deosebit atrage atenţia electroforegrama AN din miceliul în vîrstă de 5—6 zile, în care apare un număr sporit de fracţiuni, în special cu viteză de migrare mijlocie şi mare. Acest fapt poate fi pus în legătură cu intensificarea activităţii nucleazelor în culturile în vîrstă de 5—6 zile, aşa cum rezultă din figura 2.

În figura 6 redăm curbele densitometrice ale electroforegramelor AN din miceliul nesporulat şi din sporii de *A. niger* în fază latentă.

Prin electroforeză, AN din spori sînt separaţi în 12 fracţiuni, în timp ce AN din miceliu indică prezenţa a 16—17 fracţiuni. Dacă luăm în considerare viteza de migrare a diferitelor fracţiuni în gelul de agaroză, ar rezulta că din sporii în fază latentă în comparaţie cu miceliul nesporulat lipseşte fracţiunea cu viteza de migrare cea mai mare, respectiv ARN-4s, care există în celulele hifale. Această fracţiune de ARN din celulele hifale migrează la 72—75 mm, în timp ce în cazul sporilor fracţiunea cea mai îndepărtată de start se situează la circa 65 — 68 mm. Lipsesc totodată din sporii în fază latentă unele fracţiuni cu viteză de migrare mijlocie. În schimb, fracţiunile care indică ADN sau fracţiunile majore ale ARN-r sînt practic identice din punctul de vedere al migrării electroforetice atît în spori, cît şi în miceliul nesporulat. Fracţiunile corespunzătoare speciilor majore de ARN-r se diferenţiază însă prin înălţimea lor; în spori ele sînt aproape egale ca înălţime, respectiv ca intensitate, în timp ce în miceliu prima fracţiune majoră este, în general, mai înaltă decît cea de-a doua (fig. 5 şi 6).

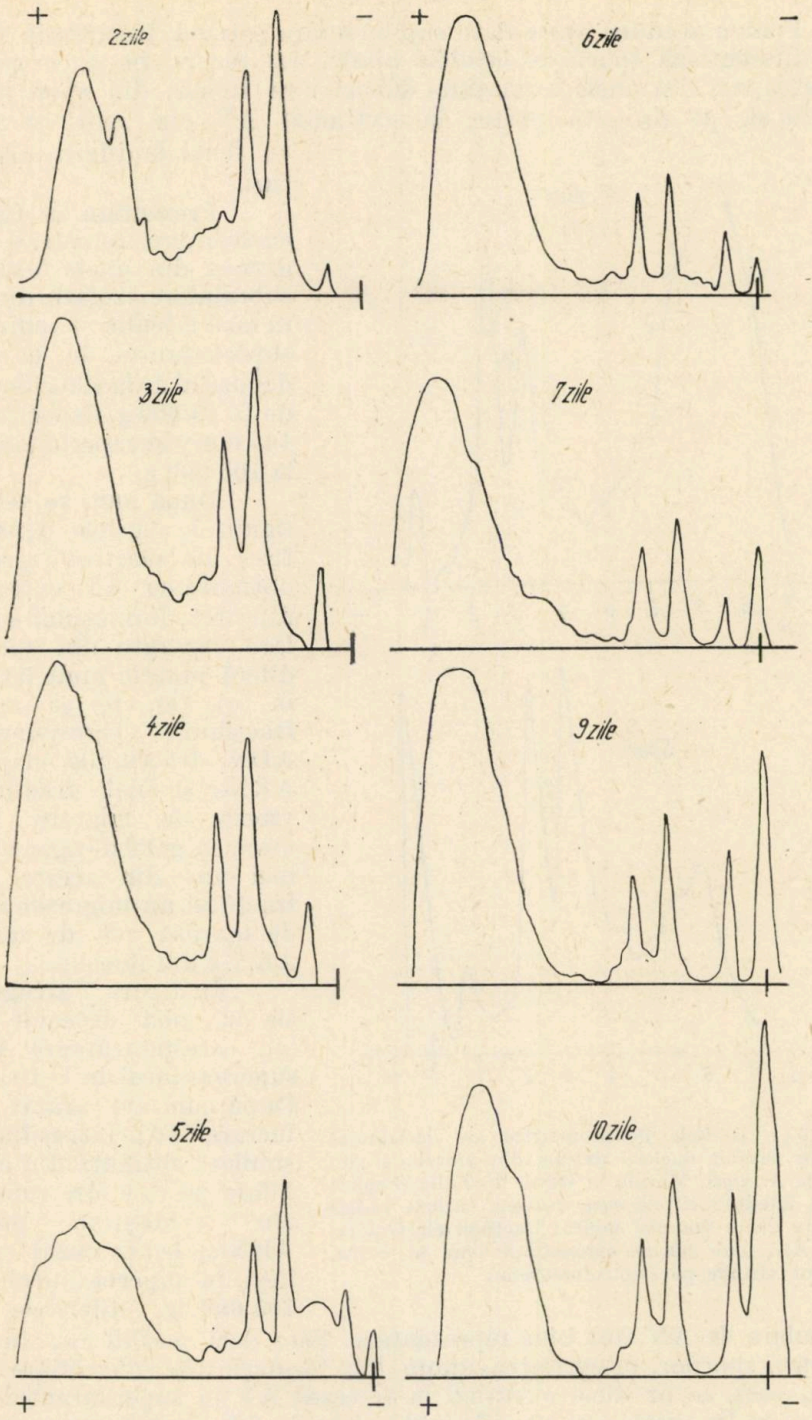


Fig. 5. — Curbele densitometrice ale electroforegramelor acizilor nucleici extraşi din miceliu de *A. niger* de diferite vîrste.

Pentru a aduce unele date suplimentare privind fracţiunile de AN care diferenţiază sporii de celulele hifale, am recurs, pe de o parte, la extracţia AN din unele formaţiuni subcelulare izolate din spori în fază latentă şi, pe de altă parte, la extracţia AN din spori şi miceliu cu fenol la diferite temperaturi.

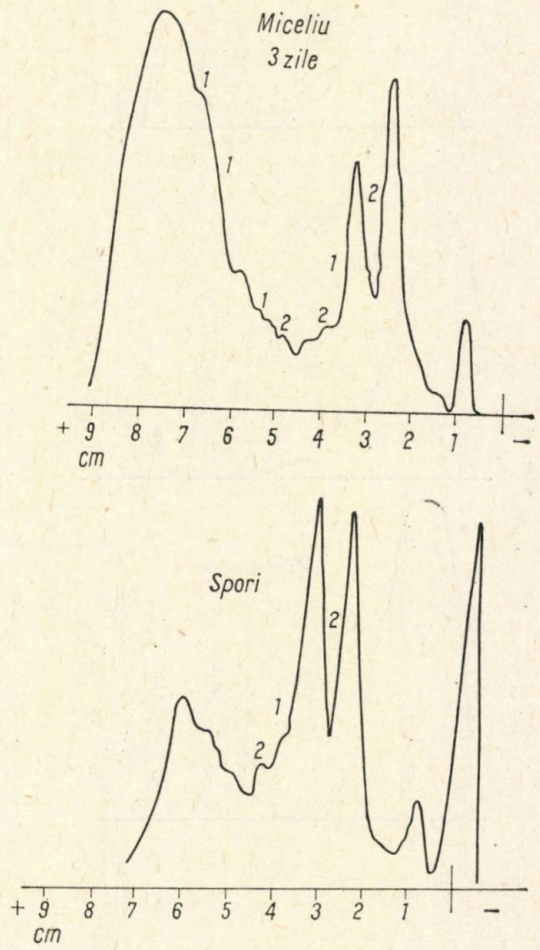


Fig. 6. — Curbele densitometrice ale electroforegramelor acizilor nucleici extraşi din miceliu şi din sporii de *A. niger*. Miceliu în vîrstă de 3 zile şi sporii în fază latentă; cifrele care însoţesc curbele indică existenţa uneia sau mai multor fracţiuni electroforetice de AN, care nu se evidenţiază bine în curbe, însă sînt vizibile pe electroforegrame.

Prezentăm în figura 7 curbele densitometrice ale AN extraşi din unele formaţiuni subcelulare izolate din spori în fază latentă, şi anume din: supernatantul de la 800 g, depozitul de la 400 g, depozitul de la 15 000 g, depozitul de la 105 000 g şi supernatantul de la 105 000 g.

După cum se vede din figura 7, curbele densitometrice ale electroforegramelor obţinute cu AN extraşi din diferitele formaţiuni subcelulare separate din spori nu diferă practic mult între ele; în (*a*), (*b*), (*c*) şi (*e*) apar fracţiunile corespunzătoare ADN, fracţiunile majore de ARN-r şi unele fracţiuni cu viteză de migrare relativ mare în gelul de agaroză, însă nici una din aceste ultime fracţiuni nu migrează în gelul de agaroză atît de mult ca ARN-s din miceliu.

În figura 7 atrage atenţia în mod deosebit curba (*e*), corespunzătoare AN din supernatantul de la 105 000 g. După cum am arătat într-o lucrare [10], într-o fracţiune similară obţinută din celulele hifale pe cale electroforetică, am evidenţiat prezenţa ARN-s, 4s. În cazul sporilor însă, în supernatantul de la 105 000 g, diferitele specii moleculare de AN sînt bine reprezentate. Este deci posibil ca, în urma mojarării sporilor, integritatea unora din formaţiunile subcelulare să fie lezată, ceea ce ar duce eventual la trecerea AN în supernatantul de la 105 000 g. În acest caz, speciile moleculare de AN identificate în această fracţiune n-ar corespunde unei realităţi celulare.

În figura 8 redăm curbele densitometrice obţinute pentru AN extraşi cu fenol din sporii în faza latentă şi din miceliul nesporulat la diferite temperaturi : 20—25°C, 45°C şi 65°C.

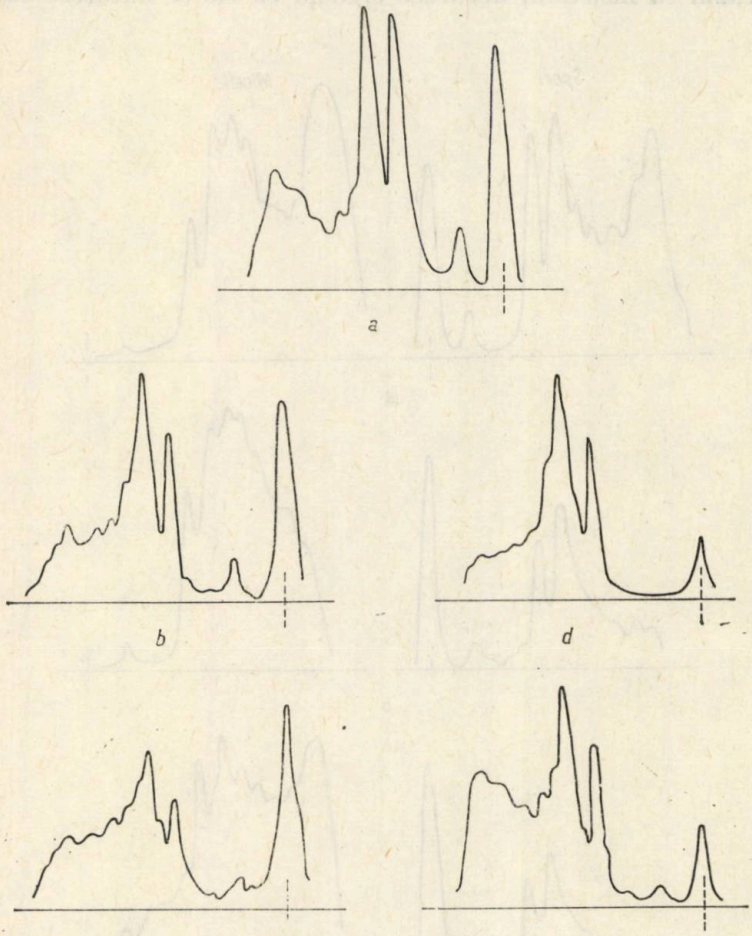


Fig. 7. — Curbele densitometrice ale electroforegramelor acizilor nucleici extraşi din unele formaţiuni subcelulare izolate din sporii de *A. niger*. Spori în fază latentă ; acizii nucleici extraşi din : *a* — supernatantul de la 800 g ; *b* — depozitele de la 4 000 g ; *c* — 15 000 g ; *d* — 105 000 g ; *e* — supernatantul de la 105 000 g.

Rezultă din figura 8 că, în cazul sporilor, electroforegramele AN extraşi cu fenol la diferite temperaturi practic nu diferă prea mult între ele ; în schimb însă, în cazul miceliului nesporulat, în special pe electroforegramele AN extraşi la 65°C, apar în plus atît faţă de spori, cît şi faţă de AN obţinuţi din miceliu la 20—25 şi 45°C o serie de fracţiuni de ARN bine conturate, cu viteze de migrare relativ mică şi mijlocie.

Dacă se compară imaginile curbelor densitometrice ale AN din spori şi miceliu obţinute pentru AN extraşi cu fenol la 20—25°C (fig. 8*a*) cu cele redate în figura 5, se remarcă o serie de diferenţe asupra cărora nu este cazul să insistăm, deoarece credem că ele se datoresc condiţiilor

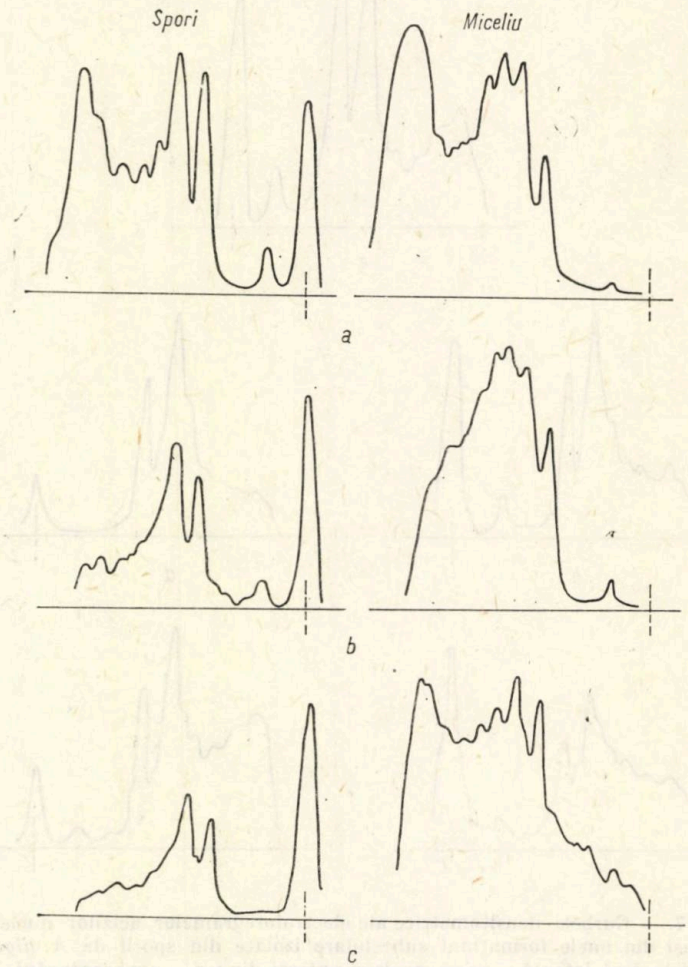


Fig. 8. — Curbele densitometrice ale electroforegramelor acizilor nucleici extraşi din miceliu şi din sporii de *A. niger* cu fenol la diferite temperaturi. Miceliu în vîrstă de 3 zile şi sporii în fază latentă : *a* — 20—25°C ; *b* — 45°C ; *c* — 65°C.

diferite în care s-au efectuat extracţiile, şi anume : în extracţia cu fenol la diferite temperaturi, sodiu dodecilsulfatul se adaugă abia după prima extracţie a AN la 20—25°C [21], pe cînd în extracţiile obişnuite el este adăugat de la început, încă înainte de deproteinizările cu fenol.

DISCUŢII

Din ansamblul rezultatelor noastre ca şi din cele obţinute de alţi autori [1], [5] — [7] reiese o metabolizare relativ intensă a AN în creşterea şi dezvoltarea miceliului de *A. niger*. În special, înaintea şi în cursul sporulării culturilor se produc modificări cantitative ale ADN şi ARN şi totodată ale activităţii DN-azelor şi RN-azelor intra- şi extracelulare. Aceste modificări cantitative ale AN şi ale activităţii nucleazelor sînt reflectate atît în spectrul electroforetic al AN obţinut în gel de agaroză, cît şi în nivelul substanţelor care absorb în ultraviolet la 256 nm, conţinute în fracţiunea acido-solubilă din miceliu şi în mediul de cultură.

O dată cu începerea sporulării culturilor, cantitatea de ADN şi ARN scade, se intensifică activitatea DN-azelor şi RN-azelor intracelulare, iar spectrul electroforetic al AN devine mai eterogen în comparaţie cu cel din miceliul tînăr nesporulat. Ulterior, probabil o dată cu maturizarea sporilor, cantitatea de ARN rămîne practic constantă la un nivel relativ scăzut, cea de ADN creşte, iar spectrul electroforetic al AN „se simplifică"; are loc totodată o scădere a activităţii DN-azelor şi RN-azelor intracelulare şi o eliberare a acestor enzime în mediul de cultură.

Rezultate întrutotul asemănătoare privind activitatea intracelulară DN-azică la pH alcalin şi RN-azică la pH acid, au fost obţinute de Nagasaki [23], care a arătat, printre altele, că activitatea acestor enzime se intensifică în miceliul de *A. niger* în vîrstă de 4—5 zile. După Nagasaki, RN-aza de pH = 4,5 ar fi implicată în degradarea ribozomilor, care are loc concomitent cu intensificarea activităţii acestei enzime şi care însoţeşte începerea sporulării culturilor de *A. niger*. Rezultatele noastre pot fi interpretate în acelaşi sens; într-adevăr, intensificarea activităţii RN-azice la pH = 4,5 o dată cu sporularea culturilor este însoţită, după cum am arătat, atît de degradarea speciilor moleculare majore de ARN-r, cît şi, în general, de sporirea numărului de fracţiuni de AN identificate după electroforeza în gel de agaroză.

Din degradarea unora dintre speciile de AN rezultă produşii aflaţi în fracţiunea acido-solubilă din miceliu şi în mediul de cultură, care determină creşterea absorbţiei la 256 nm, probabil diferite nucleotide, oligonucleotide şi alţi compuşi de metabolizare a AN. Pînă în prezent, nu ne-am preocupat de identificarea acestor produşi din fracţiunea acido-solubilă din miceliu; în schimb, după cum vom arăta într-o altă lucrare, în mediul de cultură sînt eliberate, printre altele, nucleotide de felul adenosin, citidin, guanozin şi uridin-3′(2′)fosfatului. Rezultate întrucîtva similare cu cele obţinute de noi în acest sens au fost recent publicate de Maruyama şi colab. [24], care au urmărit excreţia unor produşi de degradare a ARN-r, a unor proteine şi a unor glucide în culturile de *Escherichia coli*.

Fracţionînd AN în gel de agaroză, am arătat că ADN şi speciile moleculare majore de ARN-r din sporii în fază latentă şi din miceliul nesporulat de *A.niger* se aseamănă între ei din punctul de vedere al migrării în gel. Parţial, aceste rezultate sînt similare cu cele obţinute de Henney şi Storck [25], [26], care au dovedit, prin analiza coeficienţilor de sedimentare şi prin compoziţia în nucleotide, asemănarea care există între ribozomi, ARN-r şi ARN-s din ascosporii în fază latentă, conidiile şi hifele de *Neurospora crassa*. Prin electroforeză în gel de agaroză, noi găsim însă

unele diferenţe între AN din sporii în fază latentă şi cei din miceliul de *A.niger*; aceste diferenţe privesc atît numărul de specii moleculare de AN identificate în urma electroforezei, cît şi migrarea în gelul de agaroză a unora dintre acestea.

Diferenţa dintre numărul de specii moleculare de ARN conţinute în spori şi cele din miceliul nesporulat ar putea fi pusă în legătură cu rezultatele noastre privind analiza electroforetică a AN extraşi cu fenol la diferite temperaturi. Se ştie că prin extracţia cu fenol la diferite temperaturi, în special între 55 şi 65°C, se obţin ARN asemănători cu ADN (RNA like DNA), uşor labilizabili, care, în general, manifestă activitate mesageră [27], [21]. Or, în aceste condiţii, în miceliu, spre deosebire de sporii în fază latentă, am identificat după electroforeza în gel de agaroză unele specii moleculare de ARN cu viteză de migrare mică şi mijlocie, care s-ar putea să manifeste activitate mesageră. Sporii în fază latentă par deci să nu conţină astfel de ARN, care probabil s-ar sintetiza în cursul germinării sporilor. Rezultatele obţinute de Hoshino şi colab. [9] şi de Yanagita [8] ar veni în sprijinul acestei presupuneri; într-adevăr, schimbarea compoziţiei nucleotidice a AN imediat după germinarea sporilor de *A.niger* [9] şi iniţierea sintezei proteice [8] abia după cîteva ore de la incubarea acestora ar putea fi interpretate în sensul lipsei ARN-mesageri din sporii în fază latentă. De fapt, după Horicoshi şi Ikeda, sporii germinaţi proveniţi de la unele specii de *Aspergillus* se deosebesc de cei negerminaţi atît prin prezenţa polizomilor [28], cît şi prin capacitatea extractelor acelulare de a sintetiza proteine [29].

Referindu-ne la ARN care migrează în gelul de agaroză pînă la distanţa cea mai mare faţă de start, din rezultatele obţinute de noi au reieşit diferenţe între celulele hifale şi sporii în fază latentă. Am arătat într-o lucrare anterioară [10] că, în cazul celulelor hifale de *A.niger*, această fracţiune corespunde ARN-s obţinut din supernatantul de la 105 000 g. În cazul AN din sporii în fază latentă, cea mai îndepărtată fracţiune faţă de start se situează la o distanţă mai mică decît aceea a ARN-s din celulele hifale.

Credem însă că diferenţa de migrare electroforetică dintre fracţiunile menţionate nu poate indica lipsa ARN-s din sporii de *A. niger* în faza latentă. Van Etten şi colab. [30], precum şi Tanaka şi colab. [31], au arătat recent prezenţa ARN-s în sporii negerminaţi ai unor fungi. ARN-s din sporii negerminaţi devin activi şi îşi manifestă activitatea de acceptare a aminoacizilor numai în prezenţa unor extracte enzimatice din sporii germinaţi [30], [31]. Ar fi deci posibil ca sporii de *A.niger* în fază latentă să conţină ARN-s, care însă migrează în gelul de agaroză mai încet decît ARN-s din celulele hifale. Primii ar putea eventual să aibă moleculele întrucîtva modificate; ei ar deveni activi abia după germinarea sporilor, la cîteva ore după incubare, cînd de fapt devine evidentă şi sinteza proteică.

CONCLUZII

1. În creşterea şi dezvoltarea miceliului de *A.niger*, în special înaintea şi în cursul sporulării culturilor, se produc modificări cantitative ale

ADN şi ARN, precum şi ale activităţii DN-azelor şi RN-azelor intra- şi extracelulare.

2. Metabolizarea AN se reflectă şi prin eliberarea în fracţiunea acido-solubilă din miceliu şi în mediul de cultură a unor produşi care determină creşterea absorbţiei la 256 nm.

3. Spectrul electroforetic al AN extraşi din miceliul de diferite vîrste devine mai eterogen o dată cu începerea formării conidioforului şi se simplifică după sporularea culturilor.

4. Sporii în fază latentă conţin specii moleculare de AN asemănătoare în mare măsură cu ADN şi ARN-r din celulele hifale.

5. Din sporii în fază latentă par să lipsească ARN, care se extrag din miceliul nesporulat cu fenol la 65°C.

6. Este posibil ca ARN-s din spori să fie întrucîtva diferit de ARN-s din celulele hifale, deoarece între aceştia există diferenţe de migrare electroforetică în gelul de agaroză.

Prezentat la redacţie la 18 martie 1971

Institutul de biochimie,
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. K. Wake, T. Yamashita, S. Sasaki, J. Fac. Sci. Hokkaido Univ., V, *8(4)*, 221 (1965).
2. S. Vasu, Rev. roum. Biochim., **4**, 219 (1967).
3. S. Vasu, S. Rădulescu, în *Primul simpozion naţional asupra acizilor nucleici biologic activi*, Centrul de documentare al Academiei R. S. R., 1967, p. 192.
4. V. Bajaj, S. P. Dambe, P. S. Krishnan, Arch. Biochem. Biophys., **50**, 451 (1954).
5. A. N. Belozerski, I. S. Kulaev, Biohimia, **22**, 29 (1957).
6. I. S. Kulaev, A. N. Belozerski, Biohimia, **22**, 587 (1957).
7. A. Nishi, J. Bacteriol., **81**, 10 (1961).
8. T. Yanagita, Arch. Mikrobiol., **26**, 329 (1957).
9. J. Hoshino, A. Nishi, T. Yamagita, J. Gen. Appl. Microbiol., **8**, 233 (1962).
10. S. Vasu, Rev. roum. Biochim., **6**, 75 (1969).
11. S. Vasu, S. Rădulescu, *Microbiologia* (lucrările conferinţei Naţionale de microbiologie generală şi aplicată, Bucureşti 4 — 7 decembrie 1968), **1**, 293 (1970).
12. L. Botoşeneanu, S. Vasu, Rev. Roum. Biochim., **6**, 263 (1969).
13. C. Iordache, S. Vasu, Rev. Roum. Biochim., **6**, 305 (1969).
14. R. C. Moyer, R. Storck, Arch. Biochem. Biophys., **104**, 193 (1964).
15. M. Edelman, I. M. Verma, U. Z. Littauer, J. Mol. Biol., **49**, 67 (1970).
16. I. M. Verma, M. Edelman, M. Herzberg, U. Z. Littauer, J. Mol. Biol., **52**, 137 (1970).
17. S. Vasu, St. cerc. biochim., **6**, 71 (1963).
18. M. Ogur, G. Rosen, Arch. Biochem., **25**, 262 (1950).
19. K. Burton, Biochem. J., **62**, 315 (1956).
20. Y. Moule, Arch. Sci. Physiol., **7**, 161 (1953).
21. D. Mach, P. Vassalli, Science, **150**, 622 (1965).
22. F. Egami, K. Takahashi, T. Uchida, în *Progress in Nucleic Acids Research and Molecular Biology*, J. N. Davidson, W. E. Cohn (eds), Academic Press, New York — Londra, **3**, 59 (1964).
23. S. Nagasaki, J. Gen. Appl. Microbiol., **14**, 147 (1968).
24. H. Maruyama, M. Ono-Onitsuka, D. Mizuno, J. Biochem., Tokyo, **67**, 559 (1970).
25. H. R. Henney, R. Storck, J. Bacteriol., **85**, 822 (1963).
26. H. R. Henney, R. Storck, Science, **142**, 1675 (1963).
27. G. P. Georgiev, O. P. Samarina, M. I. Lerman, N. N. Smirnov, Nature, **200**, 83 (1963).
28. K. Horicoshi, Y. Ikeda, J. Agr. Biol. Chem. Japan, **29**, 724 (1965).

29. K. Horicoshi, Y. Ikeda, Biochem. Biophys. Acta, **166**, 505 (1968).
30. J. L. Van Etten, R. Kent Koski, M. El.-Oley Mahmould, J. Bacteriol., **100**, 1182 (1969).
31. K. Tanaka, A. Motahashi, K. Miura, T. Yanahita, J. Gen. Appl. Microbiol., **12**, 277 (1966).

NUCLEIC ACIDS IN *ASPERGILLUS NIGER* HYPHAL CELLS AND SPORES

ABSTRACT

During growth and development of *A. niger* mycelium, especially in an early phase of growth and during spores formation, quantitative changes occur in DNA and RNA levels, in intra- and extra-cellular DN-ase and RN-ase activities and some products determining the increase in optical density at 256 nm are delivered both in soluble acid fraction of mycelium and culture medium. Phenol-extracted and purified nucleic acids from *A. niger* mycelium of different ages and spores were fractionated by agarose gel electrophoresis. Electrophoretical spectra of nucleic acids, extracted from mycelium of different ages, become more heterogeneous as the cultures sporulate. Dormant spores, contain nucleic acid molecular species similar to a large extent with DNA and r-RNA from hyphal cells. Spores seem to be deprived of RNA that are extracted with phenol at 65°C from unsporulated mycelium. Spore and hyphal cell s-RNA are somewhat different, because they exhibit different electrophoretic mobilities in agarose gel.

ST. CERC. BIOCHIM., **14**, *3*, 353–355 (1971)

Atherosclerosis (*Ateroscleroza*), Proceedings of the Second International Symposium, red. Richard J. Jones, Edit. Springer, Berlin—Heidelberg—New York, 1970, 706 p., 150 fig.

Volumul cuprinde lucrările celui de-al doilea simpozion internațional avînd ca temă ateroscleroza, ținut la Chicago între 2 și 5 noiembrie 1969 sub auspiciile Societății internaționale de cardiologie, Grupului european pentru ateroscleroză, Asociației americane de ateroscleroză și Asociației de cardiologie din Chicago.

Cele 109 lucrări publicate în acest volum, clasificate în 18 capitole, sînt legate organic prin trimiteri făcute în text, cînd este cazul, de la o lucrare la alta. O inovație în prezentare este concentrarea la sfîrșitul volumului a întregii bibliografii în ordine alfabetică, cuprinzînd 1 601 referințe. Cuprinsul și lista autorilor încep volumul, iar un index alfabetic amănunțit îl încheie.

După introducere semnată de prof. G. Schettler, succesiunea capitolelor reflectă modul actual de studiere a aterosclerozei. Primele patru capitole sînt consacrate studiului de histochimie și metabolism al leziunii ateromatoase (22 de lucrări). Constituenții lipidici plasmatici formează obiectul a cinci capitole (15 lucrări). Factorii de mediu, de risc, epidemiologia și alimentația sînt tratate în patru capitole (27 de lucrări). După o masă rotundă asupra patogenezei, prevenirii și tratamentului aterosclerozei cu participarea a cinci personalități, redată în capitolul XIV, ultimele patru capitole sînt consacrate medicației și controlului în ateroscleroză (22 de lucrări).

Rezumînd lucrările simpozionului, H. Sinclair atrage atenția asupra insuficienței informațiilor privind cauzele instalării aterosclerozei și asupra rezultatelor experimentale, uneori contradictorii, alteori insuficiente din lipsa posibilității de a influența principalele trepte metabolice. Chiar și măsurile dietetice acceptate astăzi trebuie verificate.

La sfîrșitul simpozionului se propune organizarea unor acțiuni de control al aterosclerozei, după un plan care să includă o colaborare internațională.

Volumul este o sinteză a stadiului actual al aspectelor prezentate și aduce un valoros material de informare pentru cercetare.

S. M. Idu

Clinica medicală I.M.F.,
Spitalul Colțea, București

Molecular orbital studies in chemical pharmacology (*Studii de orbitali moleculari în farmacologia chimică*), Lemont B. Kier, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1970, 290 p., 66 de tabele, 67 fig.

Volumul cuprinde lucrări prezentate la Simpozionul ținut la Battelle Seattle Research Center în octombrie 1969.

În ultima vreme, tot mai mulți sînt cercetătorii care au ajuns la convingerea că cercetarea fenomenelor chimice la nivel primar molecular poate explica proprietățile biologice ale unor substanțe. Cum fenomenele chimice la nivel primar molecular depind în mare măsură de electronii de valență ai moleculelor, teoria orbitalilor moleculari pare să ofere mari avantaje în explicarea și prezicerea proprietăților biologice ale unor substanțe chiar cu molecule mari, de tipul celor existente în sistemele vii. Aceasta cu atît mai mult, cu cît în ultima vreme aplicarea tehnicii de calcul de mecanică cuantică s-a simplificat foarte mult prin apariția calculatoarelor.

Cele 11 comunicări prezentate la simpozion de către oameni de știință de renume în acest domeniu foarte nou și reunite în volumul de față abordează atît probleme teoretice de calcul al orbitalilor moleculari, cît și aplicarea practică a acestui calcul în biochimie, medicină, farmacologie.

Dintre problemele de ordin teoretic amintim : teorii semiempirice ale orbitalilor moleculari (J. R. Hoyland), aplicarea calculelor de orbitali moleculari de tip Hückel și Hückel la probleme biochimice (W. Brock Neely), interacții posibile în procesele primitive de translație (R. Rein, M. S. Rendell și J. P. Harlos) sau relații cantitative între structură, activitate și orbitalii moleculari în chimia medicală (W. P. Purcell și J. M. Clayton).

Deosebit de interesante pentru biochimiști sînt comunicările : *Structura electronică a acizilor nucleici și a constituenților lor* (B. Pullman), *Considerații de orbitali moleculari în conformația aminoacizilor* (L. B. Kier și J. M. George) sau *Studiul teoretic al fotodimerizării timinei* (R. Sayre, J. P. Harlos și R. Rein).

Corelarea structurii electronice cu activitatea biologică este prezentată pentru derivații îndolici (J. P. Green și Sungzong Kang) și medicamentele psihedelice (S. H. Snyder).

Alte două comunicări, privind aplicarea teoriei perturbației cuantice și a relațiilor de energie liberă liniară la studiul acțiunii medicamentelor (A. Cammarata), respectiv folosirea teoriei orbitalilor moleculari și a teoriei receptorilor farmacologici ca instrumente în cercetarea experimentală, ridică o problemă deosebit de interesantă prin orizontul pe care îl deschid în domeniul sintezei de medicamente.

De remarcat este și prezentarea grafică îngrijită și claritatea figurilor și a reprezentărilor structurale ale diferiților compuși.

Considerăm că prin tematica abordată lucrarea prezintă interes nu numai pentru cercetătorii din domeniul teoriei orbitalilor moleculari, ci și pentru biochimiști și farmacologi.

Olguța Macovschi

Institutul de biochimie
București

E. BUDDECKE, *Grundriss der Biochemie für Studierende der Medizin, Zahnmedizin und Naturwissenschaften* (*Elemente de biochimie pentru studenții în medicină, stomatologie și biologie*), Edit. Walter de Gruyter and Co., Berlin, 1970.

Această lucrare, în prima ediție, oferă celor care studiază medicina generală, stomatologia sau biologia o privire de ansamblu asupra cunoștințelor actuale de biochimie. Materialul prezentat în acest volum cuprinde trei capitole mari.

Primul capitol, intitulat ,,Constituenţi şi metabolism", descrie principalii componenţi ai organismelor vii : enzime, aminoacizi, acizi nucleici, proteine, hidraţi de carbon, lipide, porfirine, apă şi substanţe minerale. Se prezintă atît biochimia descriptivă a acestor componenţi (clasificare, proprietăţi, posibilităţi de dozare etc.), cît şi metabolismul lor (căi de biosinteză şi degradare). Remarcăm dezvoltarea largă a părţii referitoare la α-aminoacizii care intră în compoziţia proteinelor.

Al doilea capitol, ,,Reglarea metabolismului", cuprinde principiile generale ale reglării metabolismului, hormonii şi vitaminele. Aceştia sînt prezentaţi pe larg, atît din punct de vedere chimic, cît şi metabolic. Se remarcă o prezentare aprofundată a influenţelor biologice şi a importanţei clinice a vitaminelor şi hormonilor.

Ultimul capitol al acestui manual cuprinde biochimia funcţională a organelor (ficat, rinichi) şi ţesuturilor (muscular, nervos, conjunctiv etc.). Un paragraf special este rezervat biochimiei nutriţiei.

La sfîrşitul lucrării este ataşată o bibliografie amplă, corespunzătoare fiecăruia din capitolele prezentate. Lucrarea mai cuprinde o tabelă de date asupra dezvoltării istorice a biochimiei şi un index pe subiecte.

Folosirea acestui manual este facilitată de ataşarea unor indicaţii asupra nomenclaturii actuale în biochimie, asupra schemelor şi prescurtărilor incluse pe parcursul cărţii.

Volumul cuprinde 498 pagini de text şi mai mult de 400 de formule, tabele şi diagrame. Modul de redactare este clar şi concis, iar parcurgerea manualului se poate face cu uşurinţă, datorită numeroaselor scheme şi tablouri sinoptice ajutătoare.

Calităţile deosebite de fond şi de formă ale acestui manual relevă utilitatea şi interesul pe care le prezintă.

Doina Popov

Institutul de biochimie, Bucureşti

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici ca: Viaţa ştiinţifică, în care prin scurte note, sînt aduse la cunoştinţa cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei: congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc. Recenzii — în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea aceloraşi date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc., se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie: str. Docenţilor nr. 20, Bucureşti 63, Sectorul I.

ORSZÁGOS MŰSZAKI DOKUMENTÁCIÓS INTÉZET 1893

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

E. MACOVSCHI, **Biostructura**, 1969, 258 p., 18,50 lei.

M. ŞERBAN şi D. COTARIU, **Biochimia contracţiei musculare**, 1970, 240 p., 20,50 lei.

R. PORTOCALĂ şi L. POPA, **Acizii ribonucleici celulari şi virali**, 1966, 375 p. + 8 pl., 26 lei.

M.G. BALŞ, **Imunofluoreseenţă şi aplicaţiile ei în inframicrobiologie**, 1966, 285 p., + 18 pl., 27 lei.

ION CANTACUZINO, **Opere alese, Oeuvres choisies**, 1965, 687 p., 44 lei.

* * * **Omagiu acad. prof.** RALUCA RIPAN, 1966, 628 p. + 2 pl., 50 lei.

1971 OKT 6

La revue „Studii şi cercetări de biochimie" paraît 4 fois par an. Toute commande à l'étranger sera adresée à Întreprinderea de comerţ exterior — LIBRI, Calea Victoriei 126, Boîte postale 134—135 Bucarest, Roumanie ou à ses reprèsentants à l'étranger. En Roumanie, vous pourrez vous abonner par les bureaux de poste ou chez votre facteur.

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 14, NR. 3, P. 235 — 356, BUCUREŞTI, SEPT., 1971

I. P. „Informaţia" — c. 2497

43816

Lei 20.—

F 1330

studii şi cercetări de

biochimie

4

TOMUL 14

1971

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 14, nr. 4, p. 357—462, Bucureşti, decembrie, 1971

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacție:

VICTOR GHEȚIE

Revista apare de 4 ori pe an.

Prețul unui abonament anual este de 80 lei.

În țară abonamentele se fac la oficiile poștale, agențiile poștale, factorii poștali și difuzorii voluntari din întreprinderi și instituții.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se fac prin Întreprinderea de comerț exterior — LIBRI, Căsuța poștală 134—135 (Calea Victoriei 126), București, România, sau prin reprezentanții săi din străinătate.

Manuscrisele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență se vor trimite pe adresa comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie".

ADRESA REDACȚIEI:
București, str. Docenților, nr. 20
Sectorul I

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
B I O C H I M I E

Tomul 14, nr. 4 1971

OBSZÁGOS MŰSZAKI KÖNYVTÁRI ÉS DOKUMENTÁCIÓS KÖZPONT 1883

SUMAR

Pag.

M. CÂRSTEANU, Unele aspecte ale biochimismului pielii la diferite vertebrate 361
I. CORNOIU, Aminoacizii din biostructura frunzelor de grîu 367
V. GHEŢIE, N. ST. CHIŞIU, S. MIHĂESCU, Susceptibilitatea diferită a imunoglobulinelor A umane de tip seric şi secretor la hidroliza cu papainã. Speculaţii asupra capacităţii ,,piesei secretoare'' de a proteja molecula de IgA de acţiunea enzimelor proteolitice din secreţii 371
V. GORCEA, Influenţa gradului de extracţie al făinii de grîu din hrana şobolanilor asupra activităţii transcetolazei din eritrocite, ficat şi creier . . . 379
E. ILIESCU, Aspecte ale metabolismului oxido-reducător în timpul creşterii, maturării şi păstrării merelor 385
C. IORDACHE, Distribuţia ribonucleazei acide pe fracţiunile subcelulare obţinute din muşchii striaţi ai unor vertebrate 395
A. MIHĂESCU, Eliberarea zaharurilor hidrosolubile şi a apei din biostructura frunzelor de varză şi a fructelor de măr şi păr preîncălzite la temperaturi diferite 405
F. MOSORA, Transportul ionilor de clor între axonul gigant de calmar şi mediul înconjurător, în cazul acţiunii DNP 409
G. NEAMŢU, C. BODEA, Cercetări chemotaxonomice la plantele superioare. V. Pigmenţii carotinoidici din *Forsythia suspensa* 419
M. RABEGA, Eliberarea ionilor de potasiu, calciu, sodiu, precum şi a fosforului anorganic din biostructura ţesutului foliar de porumb, sub acţiunea inhibitorilor metabolici 425
M. SIMIONOVICI, I. A. MOLNAR, J. WINTER, N. BOEŞTEANU, E. TUCICOV Y. CRISTESCU, Acţiunea fracţiunilor de fosfolipide din seminţe de floarea-soarelui (*Helianthus annuus* L.) asupra metabolismului lipidic la şobolani 433
A. ŞTEFAN, C. RĂDULESCU, Influenţa disulfurii de tetrametiltiuram (TMTD) asupra concentraţiei electroliţilor din plasmă la şobolan 439
S. VIERU, P. MURGOCI, D. ŞANDRU, M. CRU, D. CRIŞAN, S. COMOROŞAN, Interacţiunea dintre enzime şi substratele lor iradiate 445
RECENZII 457

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
B I O C H I M I E

Tome 14, nr. 4 1971

CONTENTS

Page

M. CÂRSTEANU, Some aspects of skin biochemistry in various vertebrates 361

I. CORNOIU, The amino acids from biostructure of wheat leaves 367

V. GHEŢIE, N. ST. CHIŞIU, S. MIHĂESCU, The different susceptibility of human serum and secretory immunoglobulins A to papain digestion. Speculations on the capacity of the "secretory piece" to protect IgA molecules against the action of mucosal proteolytic enzymes 371

V. GORCEA, On the influence of the extraction degree of wheat flour in rat's food on transketolase of erytrocytes, liver and brain 379

E. ILIESCU, Aspects of the reducing-oxiding metabolism in apples during their growth, maturation and storage 385

C. IORDACHE, Distribution of acid ribonuclease in the subcellular fractions from skeletal muscles of vertebrates 395

A. MIHĂESCU, The release of hydrosoluble sugars and water from biostructure of cabbage leaves and apple and pear fruits pre-heated at different temperatures 405

F. MOSORA, Transport of chloride ions between the squid giant axon and the external medium, under DNP action 409

G. NEAMŢU, C. BODEA, Chemotaxonomic researches on higher plants. V. Carotinoid pigments of *Forsythia suspensa* Vahl. 419

M. RABEGA, Potassium, calcium, sodium and inorganic phosphorus released from the biostructure of corn foliar tissue by metabolic inhibitors 425

M. SIMIONOVICI, I. A. MOLNAR, J. WINTER, N. BOEŞTEANU, E. TUCICOV, Y. CRISTESCU, The influence of phospholipid fractions from seeds of *Hellianthus annuus* L. on lipid metabolism in rats 433

A. ŞTEFAN, C. RĂDULESCU, The influence of tetramethyltiuram disulphide upon electrolyte concentration in rat plasma 439

S. VIERU, P. MURGOCI, D. ŞANDRU, M. CRU, D. CRIŞAN, S. COMOROŞAN, The interaction between enzymes and their irradiated substrates 445

BOOK REVIEW 457

St. cerc. biochim., tomul 14, nr. 4, p. 357—462, Bucureşti, decembrie, 1971

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 4, 361–366 (1971)

UNELE ASPECTE ALE BIOCHIMISMULUI PIELII LA DIFERITE VERTEBRATE

MIOARA CÂRSTEANU

Rezumat. În lucrarea de faţă autorii au studiat exosmoza moleculelor de tipul peptidelor din straturile profunde ale pielii diferitelor vertebrate, straturi ce interesează ţesutul conjunctiv. Analiza fracţiunilor obţinute pe coloană cromatografică a arătat că aceste peptide, prinse în exosmozat, diferă cantitativ şi calitativ în funcţie de poziţia filogenetică a vertebratelor studiate. Acest fapt sugerează ipoteza complexării şi modificării procesului de biosinteză a colagenului din piele, de la vertebratele inferioare spre cele superioare.

Într-o lucrare anterioară [1], în care s-a studiat exosmoza aminoacizilor liberi din pielea unor vertebrate, în scara filogenetică, s-a constatat că acest fenomen reflectă complexarea structurii biochimice a pielii, respectiv a ţesutului conjunctiv, de la vertebratele inferioare la cele superioare.

Deoarece straturile dermice, pe măsura dezvoltării vertebratelor, îşi îmbogăţesc conţinutul în colagen, ţesutul conjunctiv devenind majoritar la vertebratele superioare, este de aşteptat ca procesul de formare a lanţurilor polipeptidice şi a fibrilelor de colagen să devină mai intens şi mai complex în scara filogenetică.

Aceste consideraţii, precum şi constatările făcute de noi cu privire la exosmoza moleculelor de tipul peptidelor din pielea umană [2], ne-au condus la cercetarea de faţă, în care am urmărit exosmoza peptidelor din straturile profunde ale pielii diferitelor vertebrate. Diferenţierea acestui proces în scara filogenetică ar veni în sprijinul ipotezei făcute de noi în lucrări anterioare [1], [2], în care se preconizau căi diferite de biosinteză şi metabolism ale colagenului, de la vertebratele inferioare la cele superioare, adaptate la specificul acestora.

Pe de altă parte, după unii autori, se pare că precursorul colagenului secretat de fibroblaşti constă din lanţuri peptidice unice, înfăşurate fiecare sub formă de helixuri singulare şi agregate abia în spaţiul extracelular, în trihelixuri moleculare, sub acţiunea mucopolizaharidelor din substanţa fundamentală; după alţi autori, se pare că această agregare în trihelix se face tot de către fibroblaşti care, în final, „secretă" moleculele de colagen complet finite, cu legături încrucişate intracatenare şi gata de a forma fibrile [3] — [11]. Or, surprinderea în exosmozat a unor molecule peptidice ar fi pledat pentru prima ipoteză, deoarece este probabil să difuzeze în exterior în special acei compuşi care se găsesc în spaţiul intercelular, gra-

niţele celulare acţionînd probabil selectiv asupra componentelor necesare procesului de biosinteză.

MATERIAL ŞI METODE

Experienţele au fost efectuate pe fragmente de piele excizată de la peşti (crap), amfibii (Rana esculenta), reptile (şarpe şi broască ţestoasă), păsări (porumbel şi găină), mamifere (şobolan şi iepure). Dimensiunile acestor fragmente au fost de 3 cm lungime şi 0,5 cm lăţime.

Imediat după excizare, fragmentul de piele, curăţat de urmele exterioare de sînge, a fost imersat în 10 ml soluţie fiziologică Tyrode şi păstrat 24 ore la 4°C. După acest timp, soluţia fiziologică în care s-a produs exosmoza a fost deproteinizată cu o soluţie de acid tricloracetic 30% şi centrifugată 10 min la 4000 rot/min.

Pentru îndepărtarea aminoacizilor liberi din soluţia tricloracetică, supernatantul liber a fost trecut pe o coloană de Zerolit 225 (SRC 10) 4 — 5% DVB, 52 — 100 mesh, de 0,9 × 10 cm, cu un debit de curgere de 2 ml/min.

Cromatografia pe coloană a peptidelor. Separarea peptidelor rămase în soluţie s-a făcut prin trecere pe o coloană de Sephadex medium G 25, 60 × 1,6 cm, cu o vizeză de curgere de 20 ml/oră, urmată de eluţie în soluţie Tyrode. Fracţiunile culese au fost analizate spectrofotometric.

Cromatografia pe hîrtie a aminoacizilor. Fracţiunile care conţineau peptide au fost hidrolizate prin fierbere cu acid clorhidric 20%, timp de 25 de ore. Fiecare hidrolizat a fost evaporat la sec pe baie de apă, iar reziduul din capsule a fost reluat cu 0,20 ml izopropanol 10%, din care s-au aplicat probe de 50 µl pe hîrtie Whatman nr. 1. Lichidul de irigare folosit a fost format din butanol : apă : acid acetic (11 :11 : 3 v/v). Spoturile au fost puse în evidenţă prin pulverizare cu o soluţie de ninhidrină 0,3% în etanol. S-au făcut reacţii specifice pentru histidină, treonină, arginină, serină şi prolină. După 18 ore de la pulverizarea cu ninhidrină, spoturile au fost transformate într-un complex cu cadmiu [12] care ulterior s-au eluat cu alcool metilic. Probele au fost fotometrate la 530 mµ, iar calculele s-au făcut în funcţie de extincţiile aminoacizilor martori decupaţi de pe aceeaşi cromatogramă.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Deoarece difuzia din piele, în condiţiile noastre de lucru, se poate produce atît pe suprafaţa externă cît şi pe suprafaţa internă a fragmentului de piele excizat, şi deoarece straturile exterioare ale pielii prezintă în scara filogenetică mari deosebiri morfostructurale, am izolat printr-o peliculă de parafină suprafaţa exterioară de rest. În felul acesta s-a realizat o exosmoză din straturile profunde ale pielii, care interesează ţesutul conjunctiv.

Rezultatele obţinute arată că din pielea de peşte nu exosmozează peptide în cantităţi dozabile.

În soluţiile de exosmoză rezultate de la *Rana esculenta*, şarpe, broască ţestoasă, porumbel, găină, şobolan şi iepure, exosmozează peptide cu o greutate moleculară probabilă cuprinsă între 1000 şi 5000.

Tabelă

Separarea cromatografică a aminoacizilor rezultați la hidroliza peptidelor exosmozate din pielea vertebratelor, μ moli/g piele umedă

Aminoacizi	Pește	Amfibii	Reptile		Păsări		Mamifere					
			șarpe	broască țestoasă	porumbel	găină	șobolan			iepure		
							Fracțiunea 1	Fracțiunea 2	Fracțiunea 3	Fracțiunea 1	Fracțiunea 2	Fracțiunea 3
Serină	—	0,420	0,400	0,405	0,100	0,090	—	—	—	—	—	—
Treonină	—	0,280	0,260	0,260	0,090	0,090	—	—	—	—	—	—
Leucină	—	0,110	0,180	0,170	0,090	0,090	—	—	—	—	—	—
Prolină	—	0,090	0,870	0,860	0,670	0,665	0,620	0,240	—	0,600	0,240	—
Acid glutamic	—	—	—	—	—	—	0,210	0,220	—	0,220	0,230	—
Acid aspartic	—	—	—	—	—	—	0,140	—	0,250	0,145	—	0,260
Acid γ-aminobutiric	—	—	—	—	—	—	0,190	—	—	0,190	—	—
Arginină	—	—	—	—	—	—	—	0,215	—	—	0,225	—
Alanină	—	—	—	—	—	—	—	—	0,230	—	—	0,230

La cromatografia pe coloană a soluţiilor care cuprind aceste peptide se obţine cîte o singură fracţiune de aceeaşi mărime în cazul vertebratelor din clasele amfibii, reptile şi păsări, studiate de noi. La amfibii şi păsări, cantitatea de peptide exosmozate din straturile profunde ale pielii este aproximativ egală, în vreme ce la reptile cantitatea de peptide este de două ori mai mare.

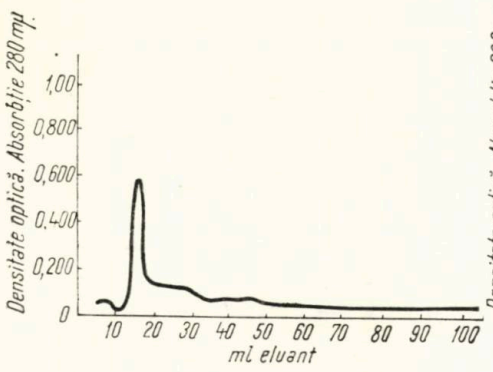


Fig. 1. — Separarea cromatografică a peptidelor exosmozate din piele de pasăre.

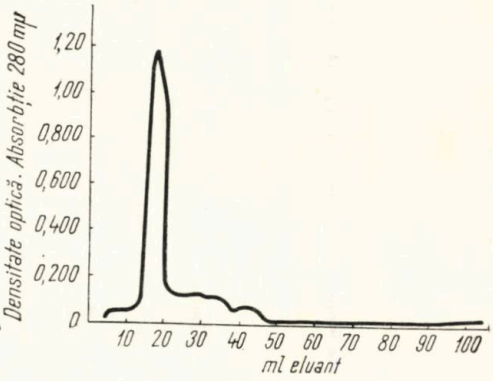


Fig. 2. — Separarea cromatografică a peptidelor exosmozate din piele de reptilă.

Hidroliza acestei fracţiuni a pus în libertate serină, treonină, izoleucină şi prolină. La clasa amfibii, prolina este în cantitate foarte mică, predominînd serina. Pe măsură ce înaintăm în scara filogenetică, cantitatea de prolină creşte în detrimentul serinei şi treoninei, care scad. Aceste fapte sînt în concordanţă cu datele din literatura de specialitate, care arată că la vertebratele inferioare colagenul din piele conţine cantităţi mult mai mari de serină şi treonină faţă de valorile acestor aminoacizi obţinute la mamifere. De asemenea, prolina şi hidroxiprolina se găsesc în cantitate mult mai mică la vertebratele inferioare, faţă de mamifere [13] — [16].

În cazul mamiferelor, prin cromatografia pe coloană a soluţiilor care cuprind peptide s-au separat trei fracţiuni.

Hidroliza primei fracţiuni a eliberat patru aminoacizi, şi anume: acid glutamic, acid aspartic, prolină şi acid γ-aminobutiric. A doua fracţiune a condus prin hidroliză la acid glutamic, arginină şi prolină şi, în sfîrşit, cea de a treia fracţiune prin hidroliză a pus în evidenţă acid aspartic şi alanină.

Este de remarcat faptul că la vertebratele la care se obţine o exosmoză crescută de prolină liberă, în speţă la vertebratele inferioare, exosmozează peptide cu un conţinut mic de prolină. Această situaţie se modifică în scara filogenetică, ajungînd să se inverseze la mamifere.

De asemenea, trebuie subliniat că, în timp ce la mamifere exosmozează din ţesutul conjunctiv al pielii peptide ce se separă cromatografic în trei fracţiuni, din straturile profunde ale pielii umane nu se obţin prin exosmoză peptide în cantităţi dozabile.

În concluzie, exosmoza moleculelor de tipul peptidelor din straturile profunde ale pielii vertebratelor oglindeşte diferenţierea procesului de biosinteză a colagenului în scara filogenetică.

Obținerea prin exosmoză a unui singur fragment peptidic la unele vertebrate din clasa amfibii, reptile și păsări, sugerează existența cu preponderență, în compoziție, a lanțurilor polipeptidice ale colagenului din pielea acestora, tocmai a acestei subunități. Apariția a trei fragmente

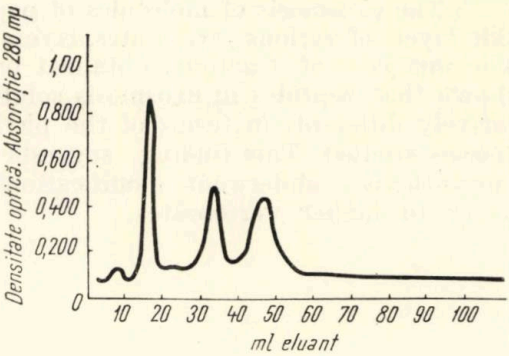


Fig. 3. — Separarea cromatografică a peptidelor exosmozate din piele de mamifer

peptidice în exosmozatul obținut pe pielea mamiferelor dovedește complexarea structurii colagenului.

În sfîrșit, exosmoza peptidelor din țesutul conjunctiv al pielii vertebratelor pledează pentru ipoteza asamblării subunităților în lanțuri polipeptidice în afara fibroblaștilor. Faptul că din straturile profunde ale pielii umane exosmozează aminoacizi liberi, dar nu exosmozează peptide, indică posibilitatea unei modificări a modului de asamblare a subunităților în lanțuri polipeptidice, caracteristică colagenului din pielea umană; de asemenea, datorită procesului de evoluție în scara vertebratelor, există probabilitatea ca la om, spre deosebire de celelalte vertebrate, această asamblare să se facă intracelular.

Prezentată la redacție la 17 aprilie 1971

Institutul de biochimie, București

BIBLIOGRAFIE

1. Mioara Cârsteanu, St. cerc. biochim., **13**, 31 (1970).
2. Mioara Cârsteanu, R. Dumitriu, Rev. roum. Biochim., **8**, 197 (1971).
3. Merchant D. J., R. H. Kann, Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.), **97**, 359 (1958).
4. Fernandez F., J. Cell. Biol., **33**, 27 (1967).
5. G. Burton, H. Green, J. Cell. Biol., **22**, 227 (1964).
6. D. J. Prockop, B. Peterkovsky, S. Vdendriend, J. Biol. Chem., **237**, 1581 (1962).
7. H. Rohr, H. Wendt, Arch. Clin. Exp. Derm., **223**, 605 (1965).
8. G. Manner, B. S. Gould, Biochem, Biophys. Acta, **72**, 243 (1963).
9. W. Montagna, *The structure and function of skin*, Acad. Press., New York-Londra, 1962, p. 127.
10. H. Bunting, Ann. N. Y. Acad. Sci., **52**, 977 (1950).
11. C. N. D. Crvickshank, M. C. Path, Brit. J. Dermat., **77**, 603 (1965).
12. J. Barrollier, Naturwissenschaften, **42**, 416 (1955).
13. R. E. Neuman, Arch. Biochem., **24**, 289 (1949).
14. K. H. Gustavson, Acta Chem. Scand., **8**, 1298 (1954).
15. N. G. Esipova, Biofizika, **2**, 461 (1957).
16. J. E. Eastoe, Biochem. J., **65**, 363 (1957).

SOME ASPECTS OF SKIN BIOCHEMISTRY IN VARIOUS VERTEBRATES

SUMMARY

The exosmosis of molecules of peptide type was studied from deep skin layers of various vertebrates, layers belonging to the connective tissue. The analysis of fractions obtained on a chromatographic column has shown that peptides in exosmosis solution are quantitatively and qualitatively different, in terms of the phylogenetic stage of the vertebrate species studied. This finding suggests that the process of skin collagen biosynthesis underwent modifications and grew in complexity from lower to higher vertebrates.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 4, 367–370 (1971)

AMINOACIZII DIN BIOSTRUCTURA FRUNZELOR DE GRÎU

IRINA CORNOIU

Rezumat. S-a determinat conținutul de aminoacizi al sucului vacuolar obținut prin stoarcerea frunzelor de plantule de grîu în vîrstă de 2 săptămîni, al sucului plasmatic obținut după înghețarea la −10°C a reziduului rămas de la stoarcerea sucului vacuolar, precum și a sucului mixt obținut prin stoarcerea frunzelor în prealabil înghețate, fie la −10°C, fie cu zăpadă carbonică. Rezultatele obținute arată că cea mai mare parte din conținutul total de aminoacizi al frunzelor este integrată în biostructura acestora și că înghețarea cu zăpadă carbonică provoacă o destrămare mai profundă a biostructurii decît înghețarea la −10°C.

Pentru cunoașterea desfășurării proceselor biochimice în materialul vegetal viu este necesară cercetarea prealabilă a repartiției substanțelor respective între biostructură și soluția intracelulară și a distribuției lor în interiorul biostructurii. Din acest punct de vedere, pînă acum au fost cercetate, pe material vegetal (țesut foliar), zaharurile reducătoare [1], ionii de potasiu, calciu și sodiu [2], fosfații și fosfataza acidă [3] și ribonucleaza [4].

În lucrarea de față s-au cercetat aminoacizii din biostructura frunzelor de grîu, ținînd seama că, după teoria biostructurii, substanțele aflate în soluția intracelulară trec în sucul vacuolar, iar cele eliberate din biostructură trec în sucul plasmatic, respectiv în sucul mixt, care este un amestec de suc vacuolar și plasmatic [5].

MATERIAL ȘI METODE

S-a lucrat pe plantule de grîu în vîrstă de 2 săptămîni, crescute în condiții de lumină artificială. Probe de cîte 50 g se storceau în presa hidraulică de laborator, tip Hafico, obținîndu-se sucul vacuolar. Pentru obținerea sucului plasmatic, reziduul rămas în presă după îndepărtarea sucului vacuolar a fost ținut 24 de ore la temperatura de −10°C. Sucul mixt a fost obținut prin două procedee: primul, prin înghețarea materialului vegetal proaspăt la temperatura de −10°C, iar al doilea, prin înghețarea materialului vegetal proaspăt cu ajutorul zăpezii carbonice.

Adsorbția aminoacizilor s-a făcut pe o coloană de 0,9 × 10 cm, încărcată cu Zerolit 225 (3 RC 10), 4–5% DVC, 52–100 mesh.

Din sucurile de analizat se introduc în coloană cîte 30 ml, se spală cu 50 ml apă distilată, pentru îndepărtarea substanțelor nereținute (ioni,

glucide, acizi organici, lipide etc.), şi se eluează aminoacizii reţinuţi de răşină cu 30 ml dintr-o soluţie de amoniac 5%. Soluţia amoniacală, colectată cantitativ, a fost evaporată la sec, într-o capsulă de porţelan, pe o baie de apă.

După eluţia aminoacizilor, coloanele de Zerolit au fost regenerate, trecîndu-se succesiv 25 ml apă distilată, 50 ml HCl N şi apă distilată, pînă la reacţie neutră.

Cromatografia pe hîrtie a aminoacizilor. Reziduul din capsule a fost reluat cu 15 ml izopropanol 10% şi s-au aplicat probe de 0,01 şi 0,02 ml pe hîrtie Whatman nr. 1. Ca lichid de irigare s-a folosit un amestec format din butanol : apă : acid acetic glacial (11 :11 : 3), efectuîndu-se descendent două irigări succesive. Evidenţierea aminoacizilor s-a făcut prin pulverizare cu o soluţie de ninhidrină 0,3 % în alcool etilic, iar dezvoltarea culorii a avut loc la temperatura camerei, la întuneric. Pe fiecare coală de hîrtie cromatografică au fost aplicate probe de 0,01 ml de aminoacizi martor (M/100).

Dozarea cantitativă a aminoacizilor individuali după separarea lor prin cromatografie pe hîrtie. După 24 de ore de la pulverizarea cu ninhidrină, spoturile individuale ale aminoacizilor, precum şi martorii respectivi, s-au decupat, s-au introdus în eprubete şi s-au tratat cu clorură de cadmiu, transformîndu-se într-un complex cu cadmiu [6]. După 48 de ore probele s-au eluat cu cîte 3 ml de aclool metilic. Eprubetele s-au agitat puternic, pentru a se face o eluţie perfectă a complexului, hîrtiile trebuind să rămînă complet albe. Eluţiile s-au fotometrat după 10 min, la 540 mμ. Calculul cantitativ s-a făcut în funcţie de extincţiile aminoacizilor martori decupaţi de pe aceeaşi cromatogramă.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Prin cromatografia pe hîrtie a aminoacizilor din sucurile vacuolare, plasmatice şi mixte au fost identificaţi 12 aminoacizi.

În tabela 1 sînt prezentate concentraţiile celor 12 aminoacizi, exprimate în mg la 100 ml suc. Se constată că sucul plasmatic este mult mai concentrat în aminoacizi decît sucul vacuolar. Concentraţia aminoacizilor în sucul mixt este şi ea cu mult mai mare decît în sucul vacuolar, fiind diferită după modul de obţinere a acestui suc. Sucul mixt obţinut din materialul vegetal, ţinut 24 ore la −10°C, are o concentraţie mai mică de aminoacizi decît cel obţinut din materialul vegetal îngheţat cu ajutorul zăpezii carbonice. Înseamnă că temperatura de −10°C nu este suficientă pentru a produce o destrămare puternică a biostructurii.

Dacă ţinem seama şi de faptul că sucul mixt se obţine în cantitate mai mare decît cel vacuolar, ajungem la concluzia că prin sucul mixt se eliberează din frunze o cantitate cu mult mai mare de aminoacizi liberi decît prin sucul vacuolar. Aceasta iese şi mai bine în evidenţă din tabela 2, care cuprinde datele cu privire la cantităţile totale de aminoacizi eliminate din frunzele de grîu, prin sucurile vacuolar, plasmatic şi mixt. Se constată că sucul plasmatic conţine o cantitate de 2—4 ori mai mare de aminoacizi decît sucul vacuolar, deşi volumul sucului plasmatic obţinut este aproximativ egal cu acela al sucului vacuolar.

Tabela 1

Conținutul de aminoacizi din sucul vacuolar plasmatic și mixt al frunzelor de plantule de grîu (mg la 100 ml). Pentru obținerea sucului plasmatic, respectiv a celui mixt, reziduul de la stoarcerea sucului vacuolar, respectiv frunzele, s-au înghețat fie la −10°C, fie cu zăpadă carbonică.

Aminoacizii	Felul sucului			
	vacuolar	plasmatic −10°C	mixt −10°C	mixtă (zăpadă carbonică)
Cisteina	16	82	64	107
Asparagina	211	600	423	597
Acid aspartic	16	76	38	51
Histidina	38	141	85	95
Serina	27	65	67	87
Acid glutamic	5	23	13	31
Treonina	11	23	13	15
Alanina	92	364	169	202
Metionina	16	61	33	41
Valina	16	61	31	48
Fenilalanina	22	88	54	95
Leucina	11	47	23	69

Tabela 2

Volumul (ml) sucului vacuolar, plasmatic și mixt obținut din 50 g frunze de plantule de grîu și cantitățile de aminoacizi (mg) cuprinse în aceste sucuri. Pentru obținerea sucului plasmatic, respectiv a celui mixt, reziduul de la stoarcerea sucului vacuolar, respectiv frunzele, s-au înghețat fie la −10°C fie cu zăpadă carbonică.

Aminoacizii	Felul sucului			
	vacuolar (18,5 ml)	plasmatic −10°C (17 ml)	mixt −10°C (39 ml)	mixt (zăpadă carbonică (39 ml)
Cisteina	3	14	25	42
Asparagina	39	102	165	230
Acid aspartic	3	13	15	20
Histidina	7	24	33	37
Serina	5	11	26	34
Acid glutamic	1	4	5	12
Treonina	2	4	5	6
Alanina	17	62	66	79
Metionina	3	10	13	16
Valina	3	10	16	19
Fenilalanina	4	15	21	37
Leucina	2	8	10	27

Aceste rezultate se explică admițînd că în țesutul foliar viu majoritatea aminoacizilor este integrată în biostructură. Cantitatea aminoacizilor din sucul mixt este și ea cam de cinci ori mai mare decît în cel vacuolar. Cantitatea de aminoacizi din sucul mixt obținut prin menținerea materialului vegetal la −10°C este mai mică decît cantitatea de aminoacizi din sucul mixt obținut prin înghețarea materialului vegetal cu ajutorul zăpezii carbonice. Înseamnă că biostructura conține cantități relativ mari de

aminoacizi pe care-i eliberează în urma destrămării ei, destrămare care poate fi mai slabă sau mai puternică în funcţie de factorul care o provoacă.

În fine, cantitatea globală a aminoacizilor cercetaţi eliminată din frunzele de grîu prin sucurile vacuolar şi plasmatic este aproximativ egală cu a celor eliminaţi prin sucul mixt obţinut prin îngheţarea materialului vegetal la —10°C. Aceasta se datoreşte faptului că atît sucul plasmatic cît şi cel mixt s-a obţinut cu ajutorul temperaturii de —10°C, care după cum s-a arătat nu provoacă o destrămare puternică a biostructurii. Situaţia este diferită în cazul sucului mixt obţinut din materialul vegetal îngheţat cu ajutorul zăpezii carbonice. Cantitatea globală de aminoacizi din acest suc este cu mult mai mare, faţă de cantitatea globală de aminoacizi eliminaţi din frunzele de grîu prin sucurile vacuolar şi plasmatic. Explicaţia se datoreşte modului diferit de obţinere a sucului plasmatic (îngheţarea materialului vegetal la —10°C) faţă de sucul mixt (îngheţarea materialului vegetal cu ajutorul zăpezii carbonice). Zăpada carbonică provoacă o acţiune de destrămare mai puternică asupra biostructurii, ducînd la o eliberare mai mare de aminoacizi pe care îi conţine.

CONCLUZII

—Cea mai mare parte din conţinutul total de aminoacizi al frunzelor de plantule de grîu este integrată în biostructura acestora.

—Îngheţarea acestor frunze la temperatura de —10°C provoacă o destrămare mai puţin profundă a biostructurii lor decît îngheţarea cu zăpadă carbonică.

Prezentată la redacţie la 14 mai 1971 *Institutul de biochimie Bucureşti*

BIBLIOGRAFIE

1. E. Macovschi, C. Mușolan, Rev. roum. biochim., **6**, 89 (1969).
2. E. Macovschi, I. Marineanu, Rev. roum. biochim., **5**, 257 (1968)
3. E. Macovschi, V. Frunzeti, Rev. roum. biochim., **5**, 165 (1968).
4. E. Macovschi, V. Frunzeti-Elefteresc u, St. cerc. biochim., **12**, 115 (1969).
5. E. Macovschi, I. Marineanu, Rev. roum. biochim., **4**, 235 (1967).
6. J. Barrollier, Naturwissenschaften, **42**, 416 (1955).

THE AMINO ACIDS FROM BIOSTRUCTURE OF WHEAT LEAVES

SUMMARY

The amino acid content was determined in the vacuolar sap from two-week old wheat leaves in plasmatic sap obtained after freezing at —10°C residues left after squeezing the vacuolar sap as well as in mixed sap obtained by squeezing previously frozen leaves, either at —10°C or by carbonic snow. Results prove that the major part of total amino acid content in leaves is integrated into their biostructure while the freezing with carbonic snow leads to a deeper breakdown of biostructure than the freezing at —10°C.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 4, 371–378 (1971)

SUSCEPTIBILITATEA DIFERITĂ A IMUNOGLOBULINELOR A UMANE DE TIP SERIC ŞI SECRETOR LA HIDROLIZA CU PAPAINĂ.

SPECULAŢII ASUPRA CAPACITĂŢII „PIESEI SECRETOARE" DE A PROTEJA MOLECULA DE IgA DE ACŢIUNEA ENZIMELOR PROTEOLITICE DIN SECREŢII

VICTOR GHEŢIE, NICOLAE ST. CHIŞIU şi SILVIA MIHĂESCU

Rezumat. S-a urmărit susceptibilitatea la papaină a IgA serice (mielom) şi colostrale umane. S-a găsit că IgA colostrală este mult mai rezistentă decît IgA serică. Această rezistenţă crescută s-ar putea datora stabilităţii pe care o conferă „piesa secretoare" moleculei de IgA colostrală. Se mai discută şi alte posibilităţi de explicare a acestei comportări diferite a celor două tipuri de IgA.

Imunoglobulina A serică se găseşte în serul sangvin uman sub două forme principale : monomer şi dimer. Forma monomeră are o constantă de sedimentare 7S şi este alcătuită din două lanţuri uşoare (lambda şi kappa) şi două lanţuri grele (alfa). Forma dimeră are o constantă de sedimentare 10S şi este alcătuită din două unităţi monomere, unite între ele prin punţi disulfidice mediate printr-o proteină de legătură J (PJ), cu greutate moleculară de 23 000—26 000 [1], [2].

Pînă acum se cunoaşteau două subclase de IgA umane serice, care prezintă diferenţe antigenice în lanţul lor greu [3] şi au lanţurile polipeptidice legate diferit : IgA_1 (lanţurile uşoare sînt legate de lanţurile grele prin punţi disulfidice) şi IgA_2 (lanţurile uşoare sînt dimerizate prin punţi disulfidice şi sînt legate de lanţurile grele prin legături de hidrogen [4]). Tot pe criterii de antigenicitate diferenţială, recent, au fost identificate şi studiate comparativ subclase noi de IgA în serul sangvin şi în secreţii la om [5]. Una dintre acestea are o migrare electroforetică mai anodică decît cele cunoscute pînă acum [6]; nivelul ei seric normal şi în colostru este relativ mic, dar a fost găsită şi în expresie dominantă, adică de tip mielomatos, la un caz clinic [5].

Imunoglobulina A de tip secretor se găseşte sub formă de dimer în secreţii ca, de exemplu, colostru, suc gastric şi intestinal, salivă etc. Au fost identificate ambele subclase, IgA_1 şi IgA_2, în serul sangvin [7]. Se pare că IgA secretoare are aceeaşi structură ca IgA serică dimer, cu diferenţa că prima conţine un component în plus, cu antigenicitate distinctă şi greutate moleculară de 58 000 [8], care a fost denumit „piesa secretoare" (PS). PS este legată de lanţurile grele ale celor doi monomeri mai ales prin legături de hidrogen [1]. Deci, IgA secretoare este compusă din două molecule de IgA serică monomeră, PJ şi PS, avînd de aceea o constantă de sedimentare 11S şi o greutate moleculară de 385 000 [7].

Degradarea proteolitică a IgA serice și secretoare pune în libertate fragmente de tip Fab, în timp ce fragmentele de tip Fc sînt distruse pînă la fragmente mai mici și peptide [9], [10]. Această ultimă acțiune se constată indiferent de enzima folosită (tripsină, pepsină, papaină) și deosebește IgA de IgG, ultima conservîndu-și regiunea Fc sub acțiunea limitată a papainei sau tripsinei. Pare deci că regiunea Fc din IgA are o conformație care o face mai susceptibilă la atacul enzimelor proteolitice. Acest lucru a fost demonstrat convingător în cîteva lucrări recente [11] — [13] care au arătat că IgA serică monomer este mai susceptibilă la atacul enzimatic decît IgG, dar că IgA secretoare este considerabil mai rezistentă. După părerea noastră, avem de-a face aici cu o consecință a faptului că enzimele nu pot desprinde decît într-o măsură redusă regiunea Fc din molecula de IgA secretoare și nu cu o rezistență intrinsecă a acestui fragment. Diferența de rezistență dintre IgA serică și cea secretoare poate consta în aceea că la ultima, regiunea Fc nu poate fi desprinsă din moleculă, iar rezistența mai mare a IgG față de IgA serică s-ar datora conformației regiunii Fc.

Incapacitatea enzimelor proteolitice de a desprinde regiunea Fc din molecula de IgA secretoare poate fi determinată de prezența PS sau/ și PJ, care pot conferi stabilitate regiunii „balama" care leagă Fab de Fc și împiedică astfel accesul enzimei în această parte a moleculei.

Participarea PJ la mascarea porțiunii de lanț polipeptidic susceptibile de a fi desfăcută de enzimele proteolitice este mai puțin probabilă, deoarece s-a dovedit că IgA serică dimer (care conține deci PJ) este susceptibilă la atacul enzimelor [11].

PS apare deci ca fiind factorul care conferă IgA secretoare rezistența la acțiunea enzimelor proteolitice. Această posibilitate a fost sugerată nu de mult de Tomasi [8] și pare a fi susținută de lucrările lui Brown și colab. [12] și Shuster [13], care au arătat că IgA secretoare este mai rezistentă la acțiunea tripsinei (chimotripsinei), respectiv pepsinei, decît cea serică.

În lucrarea de față, efectuată independent de autorii mai sus citați, am încercat să dovedim că rezistența IgA secretoare la acțiunea papainei este legată de imposibilitatea de a desprinde regiunea Fc din moleculă și că acest fenomen este legat de prezența PS atașate de această regiune.

Pentru a măsura cantitativ susceptibilitatea IgA de tip secretor și seric la acțiunea papainei, s-au analizat prin gel-filtrare hidrolizatele și s-au făcut determinări cantitative ale cromatogramelor, care au permis evaluarea cantității de IgA neatacată, a cantității de fragment Fab eliberat și a cantității de peptide mici care rezultă din degradarea avansată a regiunilor desprinse din moleculă.

MATERIAL ȘI METODE

Izolarea și purificarea IgA serice. S-a pornit de la serul unui bolnav cu mielom IgA, obținut prin bunăvoința dr. N. Luca de la Spitalul dr. I. Cantacuzino, din care IgA s-a izolat prin electroforeză preparativă în gel de agaroză [14]. IgA s-a eluat din gel printr-un procedeu cromatografic, cu tampon barbital pH 8,6, μ 0,05. Eluatul s-a dializat față de apă distilată, s-a concentrat prin pervaporare și s-a liofilizat. Pe lîngă IgA, preparatul

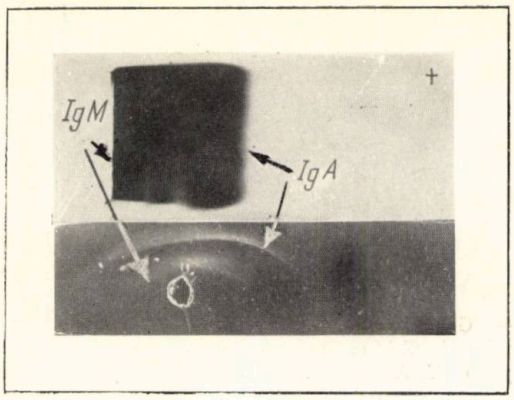


Fig. 1. — Analiza electroforetică în poliacrilamidă și imunoelectroforeza IgA serică, izolată din serul unui bolnav de mielom prin electroforeză preparativă în gel de agaroză. Antiser : ser de porc anti-IgA + IgG + IgM uman.

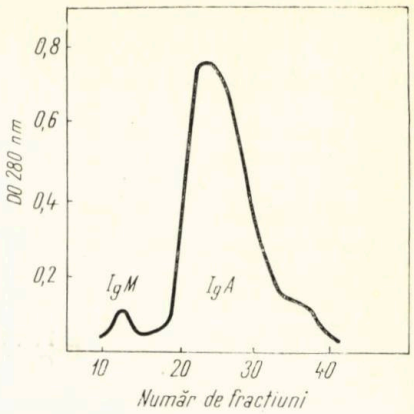


Fig. 2. — Purificarea IgA serică prin gel-filtrare pe Sephadex G—200.

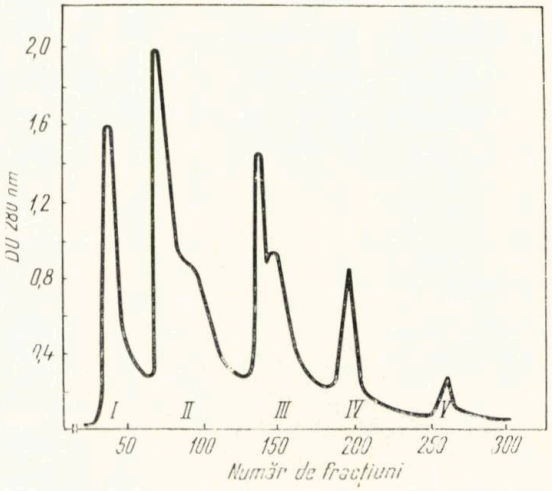


Fig. 3. — Separarea cromatografică pe TEAE-celuloză a proteinelor din colostru.

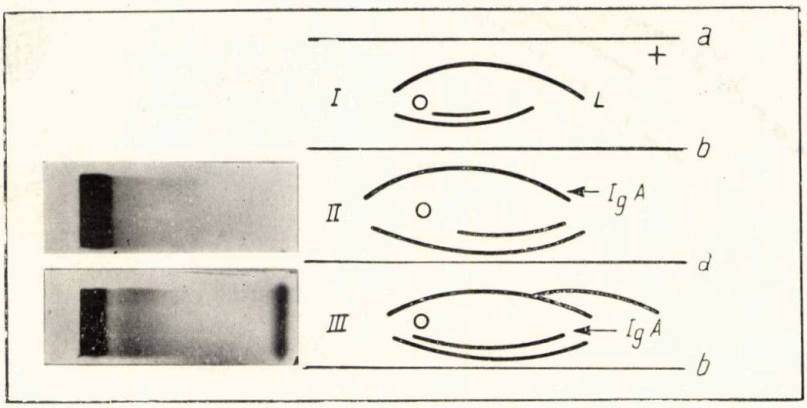


Fig. 4. — Analiza electroforetică în poliacrilamidă și imunoelectroforeza fracțiunilor I, II și III obținute prin cromatografia pe TEAE-celuloză a proteinelor din colostru.

L : linia de precipitare dată de lactoferină. Antiseruri: ser de iepure antiparotidă umană (*a*) și ser de porc antiimunoglobuline umane (*b*).

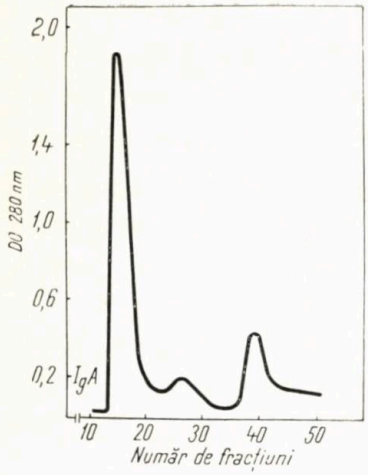


Fig. 5. — Gel-filtrarea pe Sephadex G—200 a fracțiunii II obținută prin cromatografia pe TEAE-celuloză a proteinelor din colostru.

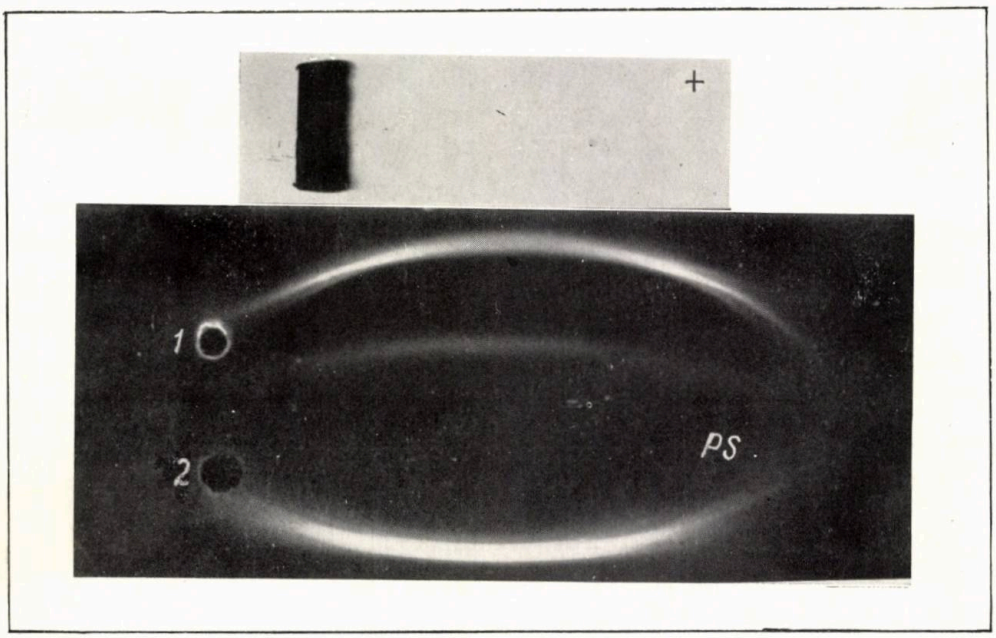


Fig. 6. — Puritatea preparatului de IgA colostrală testată prin analiză electroforetică în poliacrilamidă și imunoelectroforeză.

1 : IgA colostrală, *2* : IgA serică (mielom), PS : linia de precipitare dată de piesa secretoare prezentă în IgA colostrală. Antiser : ser de porc antilapte uman.

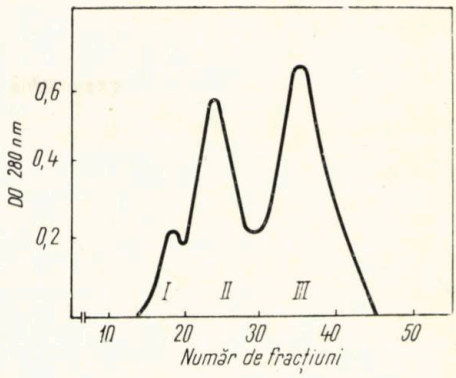


Fig. 7. — Gel-filtrarea pe Sephadex G—200 a hidrolizatului de IgA serică cu papainăă (timp de hidroliză, 5 ore).

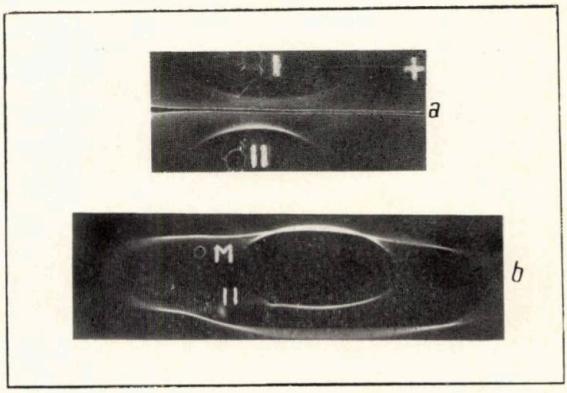


Fig. 8. — Analiza imunoelectroforetică a fracțiunilor I și II obținute prin filtrarea hidrolizatului de IgA serică pe Sephadex G—200.

I: fracțiunea cromatografică I (IgA nehidrolizată), II: fracțiunea cromatografică II (fragmentul Fab), M: IgA serică inițială. Antiseruri: ser de porc anti-IgA + + IgG + IgM uman (*a*) și ser de porc anti-IgA serică umană (*b*).

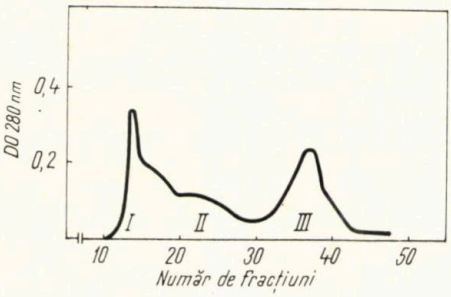


Fig. 9. — Gel-filtrarea pe Sephadex G-200 a hidrolizatului de IgA colostrală cu papainăă (timp de hidroliză, 5 ore).

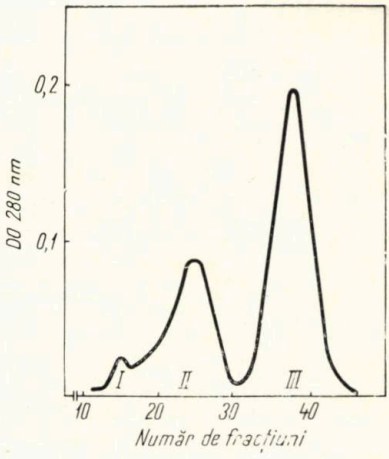


Fig. 10. — Gel-filtrarea pe Sephadex G-200 a hidrolizatului papainic de IgA colostrală, redusă și alchilată (timp de hidroliză, 5 ore).

conţine şi IgM, aşa cum rezultă din analiza imunoelectroforetică şi din analiza electroforetică în gel de poliacrilamidă (fig. 1).

Pentru îndepărtarea IgM din preparat s-a recurs la gel-filtrare pe Sephadex G-200 şi eluare cu tampon fosfat pH 8,0, 0,1 M ce conţine 0,2 M NaCl. S-a folosit o coloană de 100/2 cm. S-au colectat fracţiuni de 3,5 ml. Rezultatul separării arată că IgA avînd o greutate moleculară de 150 000 — 170 000 poate fi separată de IgM, care reprezintă 5% din proteina preparatului (fig. 2).

Izolarea şi purificarea IgA secretoare. S-a colectat laptele matern în primele două zile de la naştere (colostru). S-a centrifugat la 20 000 g timp de o oră. S-a îndepărtat depozitul şi pelicula de grăsime de la suprafaţa supernatantului. S-a îndepărtat caseina prin acidifierea supernatantului la pH 4,5. S-a neutralizat supernatantul rămas după îndepărtarea precipitatului de cazeină şi s-a precipitat cu sulfat de amoniu pînă la o saturaţie de 50%. Precipitatul s-a dizolvat în tampon acetat, pH 4, 8, 0,05 M, şi s-a dializat faţă de acest tampon 48 de ore. Precipitatul format s-a îndepărtat prin centrifugare (se îndepărtează aproximativ 50% din proteinele preparatului brut de colostru). S-a dializat apoi supernatantul faţă de tampon Tris-HCl, pH 8,0, 0,05 M, 72 ore, cu schimbări repetate ale tamponului. Dializatul s-a cromatografiat pe o coloană de 30/2 cm, umplută cu TEAE-celuloză şi echilibrată cu tamponul Tris-HCl menţionat mai sus, colectîndu-se fracţiuni de 3 ml. S-a aplicat un gradient crescător de NaCl de 0,05, 0,1, 0,2, 0,3 şi 0,8 M, pentru fiecare concentraţie eluîndu-se cîte o fracţiune proteică (fig. 3).

Fracţiunile cromatografice I—V s-au concentrat prin pervaporare, după o desalifiere prealabilă prin dializă faţă de apă distilată, şi apoi s-au liofilizat. Analiza imunoelectroforetică a fracţiunilor izolate a arătat că în fracţiunea I se găseşte lactoferina şi că IgA se găseşte distribuită în fracţiunile II şi III. În fracţiunea II, IgA este impurificată în special cu lactoferină, iar în fracţiunea III, cu alte componente proteice, neidentificate (fig. 4).

Pentru purificarea mai avansată a IgA, fracţiunile II şi IIII s-au gel-filtrat pe Sephadex G-200, în condiţiile arătate mai sus. Rezultatele sînt înfăţişate în figura 5. IgA este eluată în volumul spaţiului gol al coloanei („void" volumul), volumul său de eluţie fiind ceva mai mare decît cel al fibrinogenului, eluat ca proteină de referinţă (GM = 340 000). Preparatul de IgA astfel obţinut, din fracţiunile II sau III, prezintă o singură linie de precipitare cu serul imun polivalent utilizat (fig. 6). Linia de precipitare dată de IgA secretoare după ce anticorpii din serul anticolostru au reacţionat cu IgA serică (fig. 6) dovedeşte că acest antiser posedă anticorpi şi faţă de „piesa secretoare" cuprinsă în IgA serică preparată de noi. Puritatea IgA secretoare a fost confirmată şi prin analiza electroforetică pe gel de poliacrilamidă, obţinîndu-se o singură bandă electroforetică (fig. 6).

Hidroliza IgA cu papaiană. 10 mg de IgA, serică sau colostrală, s-au dizolvat în 1,0 ml tampon fosfat, pH 7,0, 0,1 M, ce conţine 0,01 M cisteină şi 0,005 M $EDTANa_2$. S-a adăugat apoi 0,1 mg papaină (3× crist., NBCo) dizolvată în 0,03 ml tampon. S-a incubat amestecul 2 $^1/_2$ ore, respectiv 5 ore, la 37°C, şi după aceea s-a încărcat imediat într-o coloană de Sephadex G-200 (90/1 cm), echilibrată cu tampon fosfat, pH 8,0, 0,1 M,

ce conține 0,2 M NaCl. S-au colectat fracțiuni de 2 ml. Viteza de eluție a oscilat între 10 și 15 ml/oră. Probele s-au citit la spectrofotometru la 280 nm și s-au trasat diagramele cromatografice. Procentul diferitelor fracțiuni cromatografice a fost determinat prin descompunerea piscurilor în suprafețele corespunzătoare și măsurarea acestora prin gravimetrie.

Reducerea IgA colostrale. 10 mg IgA colostrală s-au dizolvat în 1 ml tampon Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 M, ce conține ditiotreitol 0,03 M. S-a incubat amestecul la temperatura camerei, timp de o oră, într-o eprubetă închisă, s-a răcit apoi în gheață și s-a adăugat 0,1 ml soluție de iodacetamidă, în același tampon, în concentrație necesară pentru a realiza o concentrație finală de 0,04 M. S-a ținut amestecul încă o oră în gheață și apoi s-a pus la dializă față de tampon fosfat, pH 7,0 0,1 M. După o dializă exhaustivă (pentru îndepărtarea iodacetamidei), dializatul s-a hidrolizat cu papaină, în condițiile descrise mai sus.

Electroforeza în gel de poliacrilamidă și imunoelectroforeza. S-a utilizat un gel de poliacrilamidă 6%, într-o tehnică orizontală detaliată în altă lucrare [15]. Imunoelectroforeza s-a efectuat într-un gel de agaroză 1%. Condițiile de lucru s-au descris într-o altă lucrare [16]. Antiserurile folosite sînt date în explicația figurilor.

REZULTATE

Hidroliza IgA serice cu papaină. După o hidroliză de 5 ore se obține diagrama cromatografică redată în figura 7.

În fracțiunea I s-a identificat, prin electroforeză în gel de poliacrilamidă și imunoelectroforeză, IgA inițială supusă hidrolizei (fig. 8 *a*). Deci se poate considera că procentul relativ al piscului I măsoară cantitatea de IgA rămasă nehidrolizată (datele sînt prezentate în tabelă). În fracțiunea II s-au identificat fragmente de hidroliză. Ele au o mobilitate electroforetică mai mare decît IgA inițială și o greutate moleculară cuprinsă între 55 000 și 65 000 (determinată prin cromatografie în strat subțire). Sărăcirea în determinanți a fragmentului din piscul II se manifestă prin apariția unei linii de precipitare între serul imun și IgA inițială, după ce anticorpii au filtrat prin piscul II (fig. 8*b*). Nu s-a putut preciza natura fragmentului, însă probabil că el este reprezentat prin regiunea Fab a moleculei [9], [10]. În piscul III se găsesc peptide dializabile care nu pot fi evidențiate prin electroforeză sau imunoelectroforeză. Mărimea piscului III măsoară intensitatea hidrolizei IgA, valorile fiind comparabile cu cele care se obțin prin precipitare cu acid tricloracetic (peptide solubile în acid tricloracetic).

Hidroliza IgA colostrale cu papaiană. După o hidroliză de 5 ore se obține o diagramă cromatografică ca cea reprezentată în figura 9.

În piscul I s-a identificat IgA colostrală inițială, rămasă nehidrolizată. În inflexiunea de pe partea descendentă a piscului I s-a identificat de asemenea IgA intactă. După volumul de eluție, „umărul" ar putea conține o IgA colostrală monomer, rezultată din desfacerea unei părți din moleculele de IgA dimer sub acțiunea papainei. În piscul II se găsesc fragmentele de hidroliză cu caracteristici asemănătoare acelora ale fragmentelor din piscul II de la hidroliza IgA serice cu papaină. Nu s-a găsit în

acest pisc „piesa secretoare". În piscul III se găsesc peptide dializabile în proporţie de 70%; ele nu pot fi evidenţiate electroforetic sau imunoelectroforetic.

Hidroliza IgA colostrale reduse şi alchilate. IgA colostrală redusă şi alchilată este atacată considerabil de papaină, din moleculele iniţiale rămînînd doar 3%. Imaginea cromatografică este prezentată în figura 10.

Exprimarea cantitativă a rezultatelor. Pentru a aprecia susceptibilitatea celor două tipuri de IgA la acţiunea papainei, s-au făcut evaluări cantitative ale cromatogramelor. Rezultatele sînt prezentate în tabelă.

Tabelă

Rezistenţa IgA serice şi colostrale la atacul cu papaină.

Tipul de IgA	Durata hidrol. (ore)	Procentul fracţiunilor			Procent de Fab eliberat (% II din I + II)	Procent de Fc distrus (% III din II + III)
		I	II	III		
Serică	2 ½	19	45	36	70	44
	5	6	34	60	84	64
Colostrală	2 ½	55	23	22	29	49
	5	41	23	36	36	61
Colostrală redusă	5	3	33	64	91	65

Procentul fracţiunii I măsoară cantitatea de IgA supusă hidrolizei şi rămasă neatacată. S-a înglobat în acest procent şi „umărul" care se pune în evidenţă la gel-filtrarea hidrolizatului de IgA colostrală (fig. 9).

Fracţiunea II conţine fragmente cu antigenicitate Fab, de aceea procentul ei este proporţional cu fragmentul Fab desprins din moleculă. Deoarece acest procent scade prin prelungirea hidrolizei (la IgA serică) sau rămîne constant (în cazul IgA colostrale), rezultă că această fracţiune conţine, după o hidroliză de 2 ½ ore, şi fragmente care sînt atacabile prin prelungirea acţiunii papainei şi care provin, probabil, din regiunea Fc. Pentru a evalua corect dinamica desprinderii fragmentului Fab din molecula de IgA, s-a exprimat procentul fracţiunii II raportat la suma primelor două fracţiuni cromatografice, considerată 100. În acest caz, rezultatele sînt comparabile cu cele obţinute prin ultracentrifugare analitică şi care evidenţiază doar IgA şi fragmentele de hidroliză 3,5S, nu şi peptidele.

Fracţiunea III conţine peptide care provin din regiunea Fc; se ştie că fragmentul Fab (provenit din IgG) nu este atacat de enzimele proteolitice [17]. Se poate considera deci că procentul relativ al fracţiunii III este proporţional cu cantitatea de fragment Fc desprins din moleculă. Faptul că Fc din IgA secretoare nu este mai rezistent la hidroliză decît cel provenit din IgA serică — după ce a fost desprins din moleculă — se poate pune în evidenţă calculînd procentul fracţiunii III, faţă de suma ultimelor două fracţiuni cromatografice considerată egală cu 100. Este evident că dacă Fc din IgA secretoare ar fi mai rezistent la hidroliză, ar trebui ca şi raportul fr. II/fr.III să fie mai mare decît pentru IgA serică, deoarece în fracţiunea II ar fi prezente fragmente de tip Fc, în timp ce fracţiunea III ar fi corespunzător mai mică. Or, acest lucru nu se constată din datele prezentate în ultima coloană a tabelei. Se observă că procentul de Fc distrus este aproximativ egal la ambele imunoglobuline. În plus, dacă

reducerea moleculei de IgA secretoare provoacă o distrugere aproape completă a moleculelor inițiale, în schimb ea nu induce și o susceptibilitate mai ridicată a fragmentului Fc. Pare deci că ruperea legăturilor disulfidice ușurează desprinderea regiunii Fc din moleculă, dar nu și degradarea mai avansată a acesteia.

DISCUȚII

Rezultatele obținute arată clar că IgA colostrală umană este considerabil mai rezistentă la atacul cu papaină decît IgA serică. Această rezistență poate avea mai multe explicații.

Una din explicații, cea de la care a pornit această lucrare, ar fi aceea că PS interacționează cu regiunea susceptibilă la atacul papainei (regiunea „balama" a moleculei) și determină „ascunderea" ei într-o arie inaccesibilă enzimei. În favoarea acestei explicații, pe lîngă datele noastre experimentale și ale autorilor citați la începutul lucrării [12], [13], poate fi adus și faptul că PS este ancorată de regiunea Fc a IgA secretoare [18]. Regiunea Fc are o conformație labilă [19], care ar putea fi ușor modificată în urma interacțiunii cu PS, în sensul formării unei structuri mai compacte, în care să fie cuprinsă și regiunea „balama" adiacentă, conferind astfel moleculei o mai bună rigiditate și stabilitate.

Rezultatele noastre au arătat că regiunea Fc *per se* nu prezintă o rezistență mai mare la atacul papainei, dacă provine din molecula de IgA secretoare. Diferența dintre cele două tipuri de IgA constă în aceea că din IgA serică regiunea Fc se desprinde mai ușor decît din IgA secretoare, dar că o dată desfăcut, fragmentul Fc este la fel atacat în ambele cazuri. Această ultimă constatare a noastră explică datele lui Wilson și Williams [20], care, constatînd că prin hidroliza cu pepsină a IgA colostrale se obține o cantitate de peptide asemănătoare cu cea ruptă din IgA serică, trag concluzia că IgA secretoare nu este mai rezistentă la digestia peptică decît IgA serică. Această concluzie este greșită, deoarece s-a bazat pe evaluarea hidrolizei fragmentului Fc, egală la cele două tipuri de IgA, și nu pe cantitatea de IgA distrusă, care, așa cum remarcau Brown și colab. [12], este mai mică la tipul seric, chiar în experiențele autorilor.

Pot fi date și alte explicații pentru rezistența IgA secretoare la acțiunea enzimelor proteolitice. Astfel, Brown și colab. [12] au menționat că rezistența mai crescută a IgA secretoare ar putea fi legată de cantitatea relativ mare de IgA_2 în colostru [7], care ar putea fi mai rezistentă decît subclasa IgA_1, predominantă în serul sangvin. Acest punct de vedere nu mai poate fi susținut în urma lucrării lui Shuster [13], care a arătat că IgA_2 este chiar mai sensibilă la hidroliza cu pepsină decît IgA_1 fapt care pare normal, știind că în molecula de IgA_2 lanțurile grele și ușoare sînt asociate numai prin legături de hidrogen.

Pînă în prezent nu se știe dacă PS este legată la două subclase de IgA sau numai de una, și dacă PS este unică. Există unele date imunoelectroforetice după care două subclase distincte de IgA colostral ar purta două PS diferite antigenic [21]. Rezistența IgA secretoare (care conține $IgA_1 + IgA_2$), asociată la susceptibilitatea mare a subclasei IgA_2, sugerează că PS conferă acestei subclase o stabilitate chiar mai mare decît cea dată de legăturile disulfidice intercatenare, prezente în moleculele de IgA_1.

Rezistența IgA secretoare poate fi explicată și prin structura ei dimerică. Se poate presupune că dimerizarea produce o pliere complementară a celor două regiuni Fc din moleculele partenere, care își protejează astfel mai bine zonele susceptibile. În favoarea acestei posibilități poate fi adusă constatarea că nu piesa secretoare asigură dimerizarea IgA secretoare [18], ci, probabil, PJ. Desfacerea PJ din molecula de IgA colostrală cu ditiotreitol a determinat, într-adevăr, apariția susceptibilității la atacul papainei (tabela). Din păcate, acest rezultat este echivoc, deoarece se știe că reducerea practicată de noi rupe și alte legături disulfidice, inter- și intracatenare, ceea ce imprimă moleculei labilitate. De altfel, acest efect secundar, nedorit, a fost consemnat și comentat la fel și de Brown și colab. [12]. Rezultă că dimerizarea nu poate fi considerată ca un factor fără legătură cu rezistența IgA secretoare la acțiunea enzimelor proteolitice. Experiențele lui Tomasi și Czerwinski, amintite la începutul lucrării [11], au arătat că IgA serică, dimer, este susceptibilă la atacul enzimelor proteolitice, dar aceste experiențe se cer confirmate și extinse, cu atît mai mult cu cît polimerii lanțurilor alfa s-au arătat a fi mai rezistenți la digestia cu papaină decît IgA serică, monomer [22].

CONCLUZII

IgA secretoare apare mai rezistentă la atacul enzimelor proteolitice, din cauza PS care conferă moleculei o stabilitate mai ridicată. Datorită PS, moleculele de IgA secretoare pot să-și îndeplinească funcțiile biologice de apărare locală a mucoaselor, în medii în care prezența enzimelor proteolitice este frecventă.

Deoarece anticorpii de tip IgA nu fixează complementul [23], este de așteptat ca chiar o eventuală desprindere a regiunii Fc (fixatoare de complement) să nu schimbe notabil eficiența biologică a moleculei.

Prezentată la redacție la 3 iulie 1970

Laboratorul de imunochimie, Institutul de biochimie, și Laboratorul de medicină experimentală, Spitalul „Dr. I. Cantacuzino" București

BIBLIOGRAFIE

1. M. S. Halpern, M. E. Koshland, Nature, **228**, 1276 (1970).
2. J. Mestecky, J. Zikan, W. T. Butler, Science, **171**, 1163 (1971).
3. C. A. Abel, H. M. Grey, Fed. Proc, **28**, 495 (1969).
4. H. M. Grey, C. A. Abel, W. J. Yount, H. G. Kunkel, J. exp. Med., **128**, 1223 (1968).
5. N. St. Chișiu, Date nepublicate.
6. N. St. Chișiu, Rev. roum. biochim., **9**, (1972).
7. T. B. Tomasi, Ann. Rev. Med., **21**, 281 (1970).
8. T. B. Tomasi, J. Bienenstock, Adv. Immunol., **9**, 1 (1968).
9. G. M. Bernier, K. Tominaga, C. W. Easley, F. W. Putnam, Biochemistry, **4**, 2072 (1965).
10. G. Cederblad, B. G. Johansson, L. Rymo, Acta Chem. Scand., **20**, 2349 (1966).

11. T. B. Tomasi, D. S. Czerwinski, în *Immunological Deficiency Diseases in Man Birth Defects.* Original Articles, Series D. Bergsura, editor. The National Foundation March of Dimes, New York, **4**, 274 (1968).
12. W. R. Brown, R. W. Newcomb, K. Ishizaka, J. Clin. Invest., **49**, 1374 (1970).
13. J. Shuster, Immunochemistry, **8**, 1374 (1971)
14. D. Moţet, V. Gheţie, Rev. roum. biochim., **1**, 175 (1964).
15. H. D. Schell, V. Gheţie, S. Mihăescu, Rev. roum. biochim., **5**, 295 (1968).
16. L. Buzilă, V. Gheţie, Rev. roum. biochim., **6**, 183 (1969).
17. C. Motaş, V. Gheţie, Immunochemistry, **6**, 547 (1969).
18. A. R. Lawton, Proc. workshop on the secretory immunologic system, Florida, 1969, Nichd (sub tipar).
19. L. V. Abaturov, R. S. Nezlin, T. I. Vengerova, Ja. M. Varshavski, Biochim.Biophys. Acta, **194**, 386 (1969).
20. I. D. Wilson, R. C. Williams, J. Clin. Invest. **48**, 2409 (1969).
21. N. St. Chişiu, Date nepublicate.
22. M. Seligmann, F. Danon, D. Hurez, E. Mihăesco, J. L. Proud'Homme, Science, **162**, 1396 (1968).
23. T. Ishizaka, K. Ishizaka, T. Borsos, H. Rapp, J. Immunol., **97**, 716 (1966).

THE DIFFERENT SUSCEPTIBILITY OF HUMAN SERUM AND SECRETORY IMMUNOGLOBULINS A TO PAPAIN DIGESTION

SPECULATIONS ON THE CAPACITY OF THE "SECRETORY PIECE" TO PROTECT IgA MOLECULES AGAINST THE ACTION OF MUCOSAL PROTEOLYTIC ENZYMES

SUMMARY

The susceptibility of human serum (myeloma) and colostral IgA to papain was studied. Colostral IgA was found to be more resistant than serum IgA. This increased resistance would be due to the stability conferred by the "secretory piece", present only in colostral IgA molecule.

Other possibilities of explaining the differences between these two IgA types are also discussed.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 4, 379–383 (1971)

INFLUENȚA GRADULUI DE EXTRACȚIE AL FĂINII DE GRÎU DIN HRANA ȘOBOLANILOR ASUPRA ACTIVITĂȚII TRANSCETOLAZEI DIN ERITROCITE, FICAT ȘI CREIER

VIORICA GORCEA

Rezumat. — S-au hrănit 3 loturi de șobolani (tulpina Wistar) masculi, adulți tineri de 160 — 180 g: unul cu făină integrală, al 2-lea și al 3-lea cu făină de extracție mică (10%), suplimentate numai cu vitamina A și D iar cea de extracție joasă a fost făcută izonitrogenică cu cea integrală prin încorporarea de cazeină. La unul din loturile care a primit făină de extracție mică (10%) conținutul în tiamină s-a egalat cu cel existent în grîu. După 45 de zile activitatea transcetolazei la lotul hrănit cu făină albă (extracție 10%) a fost mai scăzută cu 80% pentru ficat, cu 66% pentru eritrocite, ($p<0{,}001$) și cu 32% pentru creier ($p<0{,}001$), decît la cel care a primit făina integrală. Suplimentarea făinii albe cu vitamina B_1 a prevenit scăderea, ceea ce demonstrează că ea s-a datorat deficienței tiaminice.

În alimentația omului derivatele din cereale reprezintă una din cele mai importante surse nu numai de glucide ci și de tiamină. Deoarece la măcinarea grîului, prin îndepărtarea tărîțelor, conținutul în tiamină al produsului obținut scade considerabil devenind extrem de redus în făinurile de extracție sub 50% [1], colectivul catedrei de alimentație și-a propus să studieze capacitatea făinurilor de diferite grade de extracție de a satisface nevoile de vitamină B_1 ale organismului.

Riscul unei deficiențe apare deosebit de evident, dacă se are în vedere pe de o parte sărăcirea dietei prin rafinare și pe de altă parte dublarea consumului de zahăr, care, mărind trebuințele organismului pentru această vitamină, facilitează apariția unui dezechilibru tiaminoglucidic.

Cercetările lui Randoin, Simonnet și Lecoq au arătat că nevoia de tiamină crește paralel cu cantitățile de glucide din hrană iar cercetările ulterioare au confirmat existența unui raport între nevoia de vitamină B_1 și proporția de calorii provenite din glucide. În timp ce lipidele micșorează necesarul de tiamină, glucidele au un efect contrar [2].

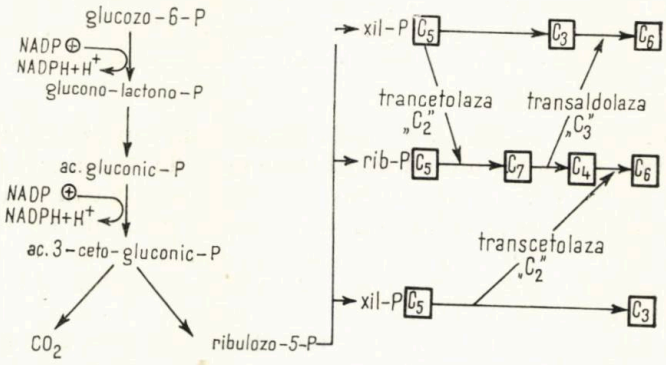
Nevoia de tiamină s-a estimat la 1 μg pentru o calorie furnizată de glucide sau 0,6 mg pentru 1 000 calorii indiferent de proveniența lor, folosind criteriul prevenirii tulburărilor metabolice și nu al deficienței clinice aparente [3].

Vitamina B_1, sub forma biologic activă de tiaminpirofosfat, cofactor esențial al unor enzime care intervin în metabolismul intermediar, permițînd substratelor de a se degrada în ciclul acizilor tricarboxilici și de a produce, în consecință, energie depozitată în legături puternic energetice, este indispensabilă respirației și vieții celulare.

Acţiunea sa nu se mărgineşte numai la controlul exclusiv al căii orientate spre oxidarea aerobă a glucozei, prezenţa sa este indispensabilă transcetolazei, sistem enzimatic din şuntul hexozomonofosfaţilor, care deşi nu reprezintă calea majoră a catabolismului glucozei, are mare importanţă în organism pentru producerea diferiţilor compuşi intermediari, cum sînt zaharurile cu 5 carboni, necesari în sinteza acidului ribonucleic, al cărui rol este binecunoscut în biosinteza proteinelor, cît şi în a NADPH indispensabil în diverse biosinteze, în special a acizilor graşi [4].

Transcetolaza existentă în ficat, creier, eritrocite, leucocite şi alte celule, fiind formată din : apotranscetolază (protein — enzimă) + tiamin-pirofosfat (vitamin — enzimă) = holotranscetolază (complex enzimatic activ), are nevoie pentru activitatea sa de vitamina B_1 [5].

Sub această formă intervine în ciclul pentozo-fosfat, unde glucoza extracelulară este convertită în glucozo-6-P intracelulară apoi oxidată în pentozo-fosfat cu eliberarea carbonului aldehidic al glucozei (C_1) sub formă de CO_2. În următoarele etape din 2 molecule de pentozo-fosfat (xilulozo--5-P şi ribozo-5-P), prin transfer de „C_2" cu ajutorul transcetolazei se formează sedoheptulozo-7-P şi triozo-3-P, apoi pe acesta din urmă se transferă un fragment de C_3 de la sedoheptulozo-7-P şi se formează hexozo-6-P şi eritrozo-4-P (conform schemei de mai jos).



Acţiunea transcetolazei în ciclul pentozo-fosfat (după P. Karlson, *Manual de biochimie*, Edit. medicală, Bucureşti, 1967, p. 461).

În deficienţa tiaminică activitatea transcetolazei este redusă şi, în consecinţă, pentoza formată din glucoza iniţială se acumulează în celule. Leziunile biochimice specifice provocate de lipsa cofactorului enzimatic la nivelul sîngelui sînt riguros legate de conţinutul în tiamină al întregului organism [6]. Deoarece scăderea activităţii transcetolazei apare într-un stadiu precoce de deficienţă, înainte de modificarea altor indicatori ai stării de nutriţie tiaminică şi de apariţia fenomenelor clinice, determinarea sa în eritrocite şi omogenate de diferite organe reprezintă testul cel mai sensibil şi specific, cu o mare aplicativitate practică [7] — [11].

Deoarece în literatura de specialitate nu sînt date referitoare la folosirea indicatorilor specifici stării de nutriţie tiaminică în condiţiile asigurării organismului cu tiamină din făina de grîu, s-a cercetat intensitatea

modificărilor apărute în activitatea transcetolazei din sîngele şi organele animalelor hrănite cu făinuri de diferite grade de extracţie.

MATERIAL ŞI METODĂ

Cercetările s-au efectuat pe 51 şobolani (tulpina Wistar) masculi, adulţi tineri în greutate de 160 — 180 g şi care anterior au avut aceeaşi alimentaţie. Animalele au fost divizate în trei loturi egale şi alimentate cu făinuri de extracţie diferită. Lotul I a primit făina integrală iar loturile II şi III făina albă de extracţie mică (10%), suplimentate numai cu trofinele inexistente în grîu (vitaminele A şi D). Făina de extracţie mică a fost adusă la acelaşi conţinut în azot cu cea integrală, prin încorporarea de cazeină fără tiamină. Spre a ne convinge că eventualele simptome biochimice de carenţă tiaminică apărute la animalele hrănite cu făină albă sînt specifice, la unul din loturile hrănite cu făină de extracţie 10% (lotul III) s-a adăugat tiamină pură, la nivelul existent în bobul de grîu, 5 mg/kg dietă.

Animalele au fost ţinute în cuşti individuale şi hrana s-a administrat prin procedeul „pair feeding", iar apa „ad libitum". Durata de observaţie pentru cele trei loturi de animale a fost de 45 zile. După acest interval, animalele au fost sacrificate prin decapitare, recoltîndu-se atît sîngele pe un anticoagulant, cît şi ficatul şi creierul.

Activitatea transcetolazei s-a determinat în hemolizatele de globule roşii, în omogenatele de ficat 5% şi în omogenatele de creier 10%, folosind metoda lui Brin [6], [12]. În acest scop, un volum de globule roşii au fost spălate de 2 ori cu o soluţie salină, apoi hemolizate prin adăugarea unui volum dublu de apă distilată. Omogenatele de ficat şi creier s-au făcut în tamponul „B" Ph = 7,4, descris de Brin. O cantitate măsurată atît din hemolizat cît şi din omogenat a fost incubată cu un exces cunoscut de ribozo-5-P, la 37°C, timp de o oră. După o oră reacţia s-a inhibat prin adăugarea de acid tricloracetic 10% iar în filtratele deproteinizate s-a măsurat spectrofotometric cîştigul net al hexozei prin metoda cu antronă, cît şi consumarea pentozei, prin metoda cu orcinol. Pentru eritrocite, activitatea transcetolazei s-a exprimat în μg de hexoză care se formează din pentoză/ml de hemolizat, în timp de o oră, cît şi în μg de riboză consumată/ml de hemolizat/oră.

Pentru omogenate, activitatea transcetolazei s-a exprimat atît în miligrame de hexoză care se formează pe gram ţesut/oră, cît şi în miligrame de riboză consumată/g ţesut/oră.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din datele individuale s-au calculat valorile medii, cu abaterea lor standard, pentru fiecare indicator şi lot (variantă dietetică) în parte. Rezultatele obţinute sînt consemnate în tabela 1.

Tabela 1

Modificarea activității transcetolazei în eritrocite, ficat și creier la șobolanii hrăniți cu făină de grîu integrală, făină albă de 10% extracție și făină albă de 10% extracție suplimentată cu vitamina B_1 (5 mg/kg dietă).

Varianta dietetică	Eritrocite		Creier		Ficat	
	hexoză µg/ml/oră	pentoză µg/ml/oră	hexoză mg/g țesut/h	pentoză mg/g țesut /h	hexoză mg/g țesut/h	pentoză mg/g țesut/h
Lot I Făină de grîu integrală	860,47± 17,35	1317± 22,9	5,38± 0,25	10,083± 0,48	25,88± 0,82	41,49± 0,56
Lot II Făina albă 10% extracție	290± 30,36	529± 41,39	3,67± 0,32	6,8± 0,38	5,3± 0,43	19,1± 0,80
Lot III Făină albă 10% extracție + vit. B_1	810,11± 25,16	1207± 33,80	5,02± 0,36	9,06± 0,28	19,13± 0,68	33,25± 0,52
Semnificația						
între I și II	$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,001$
,, I și III	$p>0,05$	$p<0,01$	$p=0,42$	$p=0,06$	$p<0,001$	$p<0,01$
,, II și III	$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,01$	$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,001$

Examinînd aceste rezultate se observă că în lotul hrănit cu făină de extracție mică (10%), activitatea transcetolazei, exprimată în hexoză, este cu 66% mai redusă în eritrocite, cu 80% în ficat și cu 32% în creier. Scăderile au fost prevenite prin suplimentarea făinii respective cu vitamină B_1, ceea ce demonstrează că ele s-au datorat insuficienței acestei vitamine. Activitatea transcetolazei evaluată prin consumul ribozei a scăzut cu 60% în eritrocite, cu 54% în ficat și cu 33% în creier. Reducerea mai marcată în eritrocite și ficat sugerează ideea că în creier se depozitează mai multă tiamină decît în alte organe sau că în stadiul de deficiență ea este luată din ficat și rinichi, care sînt viscerele cele mai bogate în vitamina B_1.

O confirmare a ipotezei că scăderea activității transcetolazei din diferite țesuturi se datorește unui aport insuficiet de tiamină furnizat de făinurile de extracție joasă este apariția de convulsii caracteristice după 45 de zile de hrănire a animalelor cu făină de extracție 10%, anorexie, pierdere în greutate, simptome care nu s-au observat la animalele hrănite cu făina albă de același grad de extracție suplimentată cu vitamina B_1.

CONCLUZII

Făina albă de extracție mică poate provoca experimental o carență tiaminică, atunci cînd este administrată un timp mai îndelungat. Reducerea activității transcetolazei în sîngele și organele animalelor hrănite cu aceste făinuri arată o scădere a aportului de vitamină B_1.

Variaţiile survenite în activitatea transcetolazei din eritrocite reflectînd modificările din viscere, determinarea acestei activităţi în sînge, produs uşor de procurat, mai ales la om, poate deveni un test util în evaluarea stării de nutriţie tiaminică.

Prezentată la redacţie la 7 iunie 1971

Catedra de igiena alimentaţiei,
I. M. F., BUCUREŞTI

BIBLIOGRAFIE

1. C. R. Jones, J. R. Fraser, T. Moran, Cereal, Chem., **37**, 9 (1960).
2. D. J. Boullin, Brit. J. Nutr., **15**, 577(1961).
3. I. Gontea, *Alimentaţia raţională a omului*, cap. *Vitamine*, Edit. didactică şi pedagogică, Bucureşti, 1971, 56 op.
4. P. Labadie, Rev. Prat., **18**, 1735(1968).
5. M. Brin, S. S. Shohet, C. S. Davidson, J. Biol. Chem., **230**, 319(1958).
6. M. brin, J. Nutr., **78**, 179(1962).
7. M. Brin, J. Amer. Med. Assoc., **187**, 762(1964).
8. M. Brin, Ann. New York Acad. Sci., **98**, 528(1962).
9. P. M. Dreyfus, New Engl. J. Med., **267**, 596 (1962).
10. N. Colombi, Farmacista, **2**, 21(1969) ; Chem. Abstr., **71**, 211051 s (1969).
11. Y. H. Chong, G. S. HO, Amer. J. Clin. Nutr., **23**, 261(1970).
12. M. Brin, J. Nutr., **71**, 273(1960).

ON THE INFLUENCE OF THE EXTRACTION DEGREE OF WHEAT FLOUR FROM RAT'S FOOD ON THE TRANSKETOLASE OF ERYTROCYTES, LIVER AND BRAIN

SUMMARY

Three groups of grown-up and young (160 — 180 g) male rats (Wistar strain) were given whole wheat flour, and low extraction flour respectively (10%), supplemented with A and D vitamins ; the nitrogen content in the low extraction flour and in the whole flour was balanced by adding to the former, casein. To one of the groups receiving low extraction flour (10%) the thiamine content was equaled to that of thiamine in wheat.

After 45 days, the transketolase activity in the group fed with white flour (10% extraction) was decreased by 50% (liver), 66% (erytrocytes $p < 0.001$) and 32% (brain $p < 0.001$) respectively, in comparison with the group fed with whole flour. Addition of B_1 vitamin to the white flour prevented this decrease thus proving that it was due to a thiamine deficiency.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 4, 385–393 (1971)

ASPECTE ALE METABOLISMULUI OXIDO-REDUCĂTOR ÎN TIMPUL CREȘTERII, MATURĂRII ȘI PĂSTRĂRII MERELOR

ELENA ILIESCU

Rezumat. S-a urmărit metabolismul merelor Jonathan și Starking cu privire la activitatea polifenoloxidazei și a peroxidazei (pH 4,94 și 7,17) și la conținutul substanțelor oxidabile cu iod (E_0 = 0,62 V) și cu permanganat de potasiu (E_0 = = 1,51 V). Fructele s-au recoltat la 137, 150, 165 și 175 de zile de la legare și s-au păstrat la 0°C. S-a stabilit că momentul optim pentru recoltare este la vîrsta de 140 — 150 de zile, cînd crește brusc activitatea polifenoloxidazei (pH 4,94) și oxidabilitatea cu iod, scade brusc activitatea peroxidazei (pH 4,94), iar oxidabilitatea cu permanganat rămîne constantă. Merele recoltate în acest moment au pierderile cele mai mici în timpul păstrării.

În ultimii ani se urmărește din ce în ce mai mult stabilirea de criterii biochimice care să marcheze evoluția creșterii și maturării fructelor [2], [5], [8], momentul cel mai potrivit pentru recoltarea lor [1], [4], [5], [6], [7] sau comportarea lor la păstrare [3], [4], [6], [7].

În acest sens, noi am continuat cercetările începute în urmă cu cîțiva ani [5], avînd acum ca obiect de studiu merele din soiurile Jonathan și Starking, cultivate la Stațiunea experimentală pomicolă Voinești-Dîmbovița, în anii 1969 — 1970.

MATERIAL ȘI METODE

Fructele s-au urmărit de la începutul lunii iulie și s-au recoltat la cinci momente, stabilite în zile de la momentul legării fructelor (I — 137; II — 150; III — 165; IV — 175 zile).

Primul moment s-a considerat cu aproximativ 30 zile înaintea recoltării masive de către sectorul de producție, și anume, cînd pigmenții antocianici apar masiv alături de clorofilă, al cărei verde intens virează spre galben. În continuare, merele s-au urmărit în timpul păstrării în silozul de tip Voinești, care nu beneficiază de condiții reglabile, dar în care temperatura s-a menținut la 0°C de la jumătatea lunii decembrie pînă aproape de sfîrșitul lunii martie, iar umiditatea relativă a aerului a oscilat între 80 și 90%.

În timpul creșterii, analizele s-au efectuat pe un număr de 24 fructe (recoltate din 3 pomi, din toate punctele cardinale ale fiecăruia), iar în timpul păstrării — pe un număr de 12 fructe (lunar).

Determinările s-au efectuat pe o probă medie, în care din fiecare fruct s-au luat cîte două secţiuni opuse : partea pigmentată intens şi opusul ei, pigmentat mai slab, cînd a fost cazul.

Pentru urmărirea creşterii fructelor, acestea s-au cîntărit individual, calculîndu-se greutatea medie în g/fruct. Extractul apos pentru analize s-a pregătit prin fierberea uşoară a probei de fructe (20%) timp de 30 min, pasarea acestora, continuarea fierberii 15 min, aducere la cotă, filtrare. Oxidabilitatea cu iod s-a determinat pe o parte alicotă în extractul apos, la care s-a adăugat o soluţie de iod în exces, iar după o oră s-a titrat iodul rămas liber cu tiosulfat, în prezenţă de amidon. Oxidabilitatea cu permanganat de potasiu s-a determinat prin titrarea directă a unei părţi alicote de extract apos, în mediu acid, pînă la persistenţa culorii roz timp de 15 s. Activitatea polifenoloxidazei (PfO) şi a peroxidazei (PO) s-a determinat iodometric [5], folosind suspensii de fruct în tampon fosfatic la pH 4,94 şi 7,17. Rezultatele sînt exprimate în mg acid ascorbic oxidat în 2 min de 3 g fruct proaspăt.

REZULTATE

Urmărind creşterea în greutate a fructelor (fig. 1), se observă că pînă la sfîrşitul lunii septembrie aceasta este continuu ascendentă, la ambele soiuri. În ce priveşte ritmul creşterii, însă, soiul Jonathan arată o ascensiune rapidă a acestuia pînă la sfîrşitul lunii iulie, şi mai lentă pînă la sfîr-

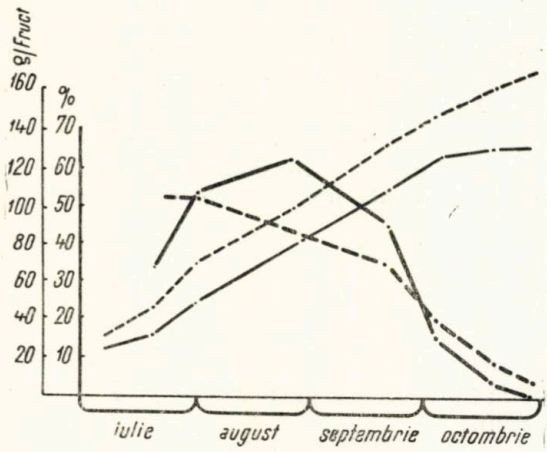


Fig. 1. — Greutatea fructelor soiurilor Jonathan (————) şi Starking (– – – – –) şi ritmul creşterii (————: – · – · –).

şitul lunii august (atingînd un spor de peste 60% faţă de greutatea anterioară cu trei săptămîni). Acest ritm începe apoi să scadă potrivit, pînă în septembrie, şi rapid în ultima decadă a acestei luni. În luna octombrie el scade continuu, pînă la atingerea valorii zero către sfîrşitul acesteia. Merele Starking au un ritm de creştere ascendent pînă la sfîrşitul lunii iulie, apoi acesta descreşte cu o viteză relativ constantă pînă la 20 septembrie, după care scade mai abrupt, ca şi la merele Jonathan.

În privinţa oxidabilităţii cu iod (tabela 1), mersul acesteia pentru ambele soiuri este perfect asemănător, cu o diferenţă doar cantitativă, care

le deosebeşte începînd cu decada a treia a lunii iulie : merele Starking au cifre cu pînă la 29% mai mari decît merele Jonathan.

Oxidabilitatea cu permanganat de potasiu (tabela 1) este foarte ridicată la începutul lunii iulie, scăzînd apoi continuu şi abrupt pînă la sfîrşitul lunii august, cînd scăderea este mai lentă.

În timpul păstrării, fructele recoltate la cele patru momente se manifestă foarte asemănător, cu valori apropiate numeric, sub aspectul variaţiei cantitative a substanţelor oxidabile cu iod şi cu permanganat, din care cauză prezentăm numai momentul II, ale cărui variaţii sînt practic identice cu cele din momentul I şi se observă clar din tabel.

Referindu-ne la activitatea oxidazelor în fructe (tabelele 2 şi 3), se observă că la începutul perioadei de creştere (pînă la începutul lunii iulie) ea este foarte ridicată cît priveşte atît PfO cît şi PO. Totuşi, principală rămîne activitatea PfO, care este de 3—5 ori mai mare decît aceea a PO. Activitatea PO la pH 7,17 nu se manifestă practic (cu excepţia datei de 20 septembrie). La pH 4,94, însă, ea se manifestă aproximativ invers faţă de aceea a PfO.

În timpul păstrării (se prezintă numai datele cele mai semnificative), variaţia activităţii PfO este asemănătoare la merele recoltate în cele patru momente, asemănîndu-se mai mult I cu II şi III cu IV. Activitatea $PfO_{7,17}$ (cu excepţia merelor Jonathan I, care prezintă o creştere notabilă la început) scade continuu pînă la sfîrşitul păstrării, la toate momentele ambelor soiuri. Peroxidaza se manifestă, şi în timpul păstrării, preponderent la pH 4,94 şi puţin la pH 7,17.

În ce priveşte suma activităţii PfO şi PO la pH 4,94 (tabelele 2 şi 3), ea scade practic continuu în timpul creşterii fructelor. În timpul păstrării lor, mersul curbei imaginative este acelaşi cu al activităţii PfO.

Raportul activităţilor PfO la pH 4,94 şi 7,17 (de regulă subunitar la Jonathan şi supraunitar la Starking) nu prezintă valori concludente. Raportul PfO/PO la pH 4,94 are variaţii sensibile în timpul creşterii fructelor, marcînd o creştere bruscă la momentul II.

În privinţa calităţii de păstrare a fructelor recoltate în cele patru momente, sub aspect organoleptic fructele momentelor I şi II au fost superioare celor din momentele III şi IV. De altfel, diferenţierea aceasta s-a manifestat şi în privinţa pierderilor datorite degradării fructelor (tabela 4) : se observă că pierderile cele mai mici le-au avut merele recoltate la momentele I (Starking) şi II (Jonathan), datele pentru Jonathan, fiind, totuşi, apropiate pentru momentele II şi I.

DISCUŢII

Metabolismul fructelor celor două soiuri, sub aspectele studiate, este foarte asemănător, cu excepţia activităţii PfO, care le diferenţiază net : la Jonathan enzima este mai activă la pH neutru (7,17), pe cînd la Starking — la pH acid (4,94). Şi încă : la merele Jonathan activităţile PfO la cele două pH-uri sînt diferenţiate mai mult (mai ales în primele stadii ale dezvoltării fructului), pe cînd la Starking ele sînt foarte apropiate ca valori, în perioada de creştere, pînă la momentul I. Oricum, cifrele observate la

soiul Starking sînt mai ridicate decît la soiul Jonathan, atestînd un metabolism mai activ.

Aşa cum am constatat într-un studiu asupra cireşelor [5] şi cum se poate presupune şi din datele lucrării de faţă, ţesutul fructelor prezintă, imediat după legare, o activitate oxidazică foarte înaltă, impusă — desigur — de nevoia mare de energie pentru masiva diviziune a celulelor. Ea scade continuu pînă în momentul cînd creşterea încetineşte şi începe maturarea fructelor, început ce coincide cu punctul climacteric. Şi în cazul merelor se observă aceeaşi activitate ridicată la începutul creşterii lor, cînd fructele sînt mici (11 — 14 g) şi scade treptat pînă la decada a treia a lunii septembrie. Paralel, scade şi cantitatea substanţelor oxidabile cu iod, ca şi a celor oxidabile cu permanganat. Creşterea ulterioară a activităţii PfO (II şi III), paralel cu creşterea cantităţii substanţelor oxidabile cu iod ($E_0 = 0{,}62$ V), arată existenţa unei relaţii pozitive între acestea : probabil că substanţele-vehicul ale sistemelor redox ce se realizează prin intermediul polifenoloxidazei sînt dintr-o categorie cu un potenţial scăzut. În acelaşi timp, raportul dintre activităţile PfO şi PO la pH 4,94 creşte brusc, datorită atît creşterii activităţii PfO, cît mai ales scăderii aceleia a PO.

Substanţele înalt energetice (oxidabile cu permanganat) ($E_0 = 1{,}51$ V) sînt în cantitate foarte mare la începutul creşterii fructului. Cum cantitatea lor scade continuu de-a lungul acestei perioade, reiese că ele nu sînt implicate decît în procesele iniţiale de diviziune intensă, neavînd vreo legătură cu diferitele stadii ulterioare ale dezvoltării fructului. O dată ce dezvoltarea

Tabela 1

Oxidabilitatea merelor din soiurile Jonathan şi Starking (ml 0,1 N/100 g fruct)

Perioada	Momentul	Data	Jonathan			Starking		
			I_2	$KMnO_4$	$KMnO_4/I_2$	I_2	$KMnO_4$	$KMnO_4/I_2$
Creştere		5 iulie	16,77	92,30	5,50	16,77	141,32	8,42
		19 ,,	18,69	68,32	3,65	19,82	75,77	3,82
		31 ,,	17,25	45,25	2,62	18,58	58,63	3,15
		25 august	14,00	27,67	1,97	17,41	35,29	2,03
	I	20 septemb.	13,18	22,55	1,71	17,07	24,20	1,42
	II	3 octomb.	15,04	20,49	1,36	17,03	20,96	1,23
	III	18 ,,	16,43	21,56	1,31	18,59	24,07	1,29
	IV	28 ,,	15,17	20,13	1,32	16,46	21,15	1,28
Păstrare	II	6 noiemb.	15,26	23,94	1,56	18,14	27,18	1,49
		2 decemb.	15,52	22,00	1,41	15,14	27,90	1,84
		27 ,,	14,07	19,23	1,36	15,00	20,52	1,37
		3 febr.	14,86	18,84	1,26	18,19	21,63	1,19
		3 martie	15,54	18,16	1,16	18,19	25,92	1,42
		4 aprilie	15,74	16,12	1,02	23,61	15,60	0,66
		20 ,,	25,91	1,66	0,06	17,72	11,72	0,66

Tabela 2

Activitatea polifenoloxidazei (PfO) și a peroxidazei (PO) în merele Jonathan, la pH 4,94 și 7,17

Perioada	Momentul	Data	PfO		PO		PfO+PO 4,94	$\frac{PfO_{4,94}}{PfO_{7,17}}$	$\frac{PfO_{4,94}}{PO_{4,94}}$
			4,94	7,17	4,94	7,17			
Creștere		5 iulie	9,40	16,17	5,83	0	15,23	0,58	1,61
		19 ,,	9,29	12,39	4,89	0	14,18	0,75	1,90
		31 ,,	8,48	10,00	2,54	0	11,02	0,85	3,33
		25 august	7,22	9,23	4,87	0	12,09	0,78	1,48
	I	20 septemb.	4,79	5,95	4,46	0,99	9,25	0,80	1,07
	II	3 octomb.	6,81	7,15	1,53	0	8,34	0,95	4,45
	III	18 ,,	7,18	9,63	0,92	0	8,10	0,74	7,69
	IV	28 ,,	6,37	9,80	0,87	0	7,24	0,65	7,32
Păstrare	I	20 septemb.	4,79	5,95	4,46	0,99	9,25	0,80	1,07
		19 noiemb.	5,25	7,57	0,64	0	5,89	0,69	8,20
		19 decemb.	4,03	4,87	0,37	0	4,40	0,82	10,89
		20 febr.	5,30	3,80	1,35	0	6,65	1,39	3,92
		2 aprilie	7,15	0,17	7,12	0	8,00	42,06	1,00
	II	3 octomb.	6,81	7,15	1,53	0	8,34	0,95	4,45
		6 noiemb.	5,25	7,38	1,13	0	6,38	0,76	4,64
		24 decemb.	4,60	5,85	0,43	0	5,03	0,79	13,60
		19 martie	5,33	3,12	4,37	2,05	9,70	1,71	1,22
		2 aprilie	6,61	0	6,95	0	13,56	∞	0,95
	III	18 octomb.	7,18	9,63	0,92	0	8,10	0,74	7,69
		19 decemb.	5,38	5,71	0,25	0,17	5,63	0,94	21,52
		24 ian.	3,03	3,08	0	0	3,03	0,98	∞
		19 martie	5,91	2,63	7,57	1,48	13,48	2,24	0,78
		6 aprilie	6,59	2,55	3,90	2,88	10,49	2,58	1,69
	IV	28 octomb.	6,37	9,80	0,87	0	7,27	0,65	7,32
		27 decemb.	5,19	7,20	0,27	0,84	5,46	0,72	19,22
		2 febr.	2,43	3,08	0	0	2,43	0,79	∞
		19 martie	2,75	1,31	6,46	1,05	9,21	1,31	0,42
		6 aprilie	4,10	2,05	4,07	2,71	8,17	2,00	1,00

Tabela 3

Activitatea polifenoloxidazei (PfO) şi a peroxidazei (PO) în merele Starking, la pH 4,94 şi 7,17

Perioada	Momentul	Data	PfO		PO		PfO+PO 4,94	$PfO_{4,94}$	$PfO_{4,94}$
			4,94	7,17	4,94	7,17		$PfO_{7,17}$	$PO_{4,94}$
Creştere		5 iulie	17,66	20,83	4,33	0	21,99	0,85	4,08
		19 ,,	15,65	14,67	0,81	0	16,46	1,08	19,32
		31 ,,	11,19	10,70	1,19	0	12,38	1,10	9,40
		25 august	10,91	10,24	1,68	0	12,59	1,07	6,49
	I	20 septemb.	7,77	7,44	3,97	1,82	11,74	1,04	1,95
	II	3 octomb.	10,38	8,34	0,34	0	10,72	1,24	30,53
	III	18 ,,	11,47	8,53	0,49	0	11,96	1,34	23,41
	IV	28 ,,	9,45	9,14	0,65	0	10,10	1,03	14,54
Păstrare	I	20 septemb.	7,77	7,44	3,97	1,82	11,74	1,04	1,95
		30 octomb.	8,82	7,18	0,48	0	9,30	1,23	18,37
		19 decemb.	9,07	7,06	0,17	0	9,24	1,26	53,35
		20 febr.	7,16	1,95	0	0	7,16	3,67	∞
		2 aprilie	11,46	0,85	7,96	0	19,42	13,48	1,44
	II	3 octomb.	10,38	8,34	0,34	0	10,72	1,24	30,53
		6 noiemb.	9,34	7,87	0,82	0	10,16	1,18	11,39
		3 febr.	6,82	3,25	0	0	6,82	2,09	∞
		19 martie	8,45	1,82	3,15	0,88	11,60	4,64	2,68
		2 aprilie	10,17	0	7,12	0	17,37	∞	1,43
	III	18 octomb.	11,47	8,53	0,49	0	11,96	1,34	23,41
		19 decemb.	9,20	6,72	0,17	0,34	9,37	1,37	54,12
		24 ian.	7,79	4,87	0	0	4,87	1,59	∞
		19 martie	8,30	3,46	7,90	1,97	16,20	2,40	1,05
		6 aprilie	10,86	3,30	4,57	3,90	15,43	3,30	2,37
	IV	28 octomb.	9,45	9,14	0,65	0	10,10	1,03	14,54
		27 decemb.	8,71	5,69	0	0	8,71	1,53	∞
		2 febr.	7,79	4,87	0	0	7,79	1,60	∞
		19 martie	7,95	3,70	8,09	2,34	16,04	2,15	0,98
		6 aprilie	8,64	3,73	5,25	4,23	13,89	2,31	1,64

Tabela 4

Pierderile prin degradare, la sfîrşitul perioadei de păstrare a fructelor (20 aprilie)

Momentul	Data recoltării	Nr. zile de la legare	Pierderi (%)	
			Jonathan	Starking
I	20 septemb.	137	9,38	9,77
II	3 octomb.	150	7,30	11,92
III	18 ,,	165	16,60	15,50
IV	28 ,,	175	23,04	19,36

fructului a atins aşa-numitul punct climacteric (începutul maturării sale), aceste substanţe au ajuns deja la nivelul cel mai scăzut, care apoi rămîne constant. Deci, nu se vădeşte vreo corelaţie între substanţele cu potenţial înalt de oxidare şi activitatea oxidazică.

Examinînd raportul dintre cantităţile de substanţe oxidabile cu permanganat şi cu iod, vom constata că acesta este foarte ridicat la începutul lunii iulie (5,50 la Jonathan şi 8,42 la Starking), ceea ce corespunde cu nevoia de energie pentru creşterea masivă a ţesutului, energie asigurată de substanţe cu potenţial ridicat de oxidare. Acest raport scade apoi continuu pînă la momentele II—III, practic paralel cu ritmul creşterii, probabil paralel cu încetinirea ritmului diviziunilor celulare, creşterea fructului avînd loc şi prin creşterea volumului celular, pe seama acumulărilor. Menţinerea ulterioară la nivel constant a acestui raport ar marca încetarea creşterii prin diviziuni celulare şi începutul masiv al metabolizării elementelor acumulate prin absorbţie şi sinteză clorofiliană, adică începutul procesului de maturare a fructului. De altfel, activitatea iniţială intensă a PO ar putea indica şi ea o cantitate mărită de substanţe peroxidice, a căror bogăţie în oxigen corespunde unei energii ridicate.

Referindu-ne la perioada păstrării fructelor recoltate în cele patru momente, se observă că activitatea oxidazică se manifestă, în general, asemănător. Totuşi, $PfO_{7,17}$ diferenţiază fructele I şi II de III şi IV : la sfîrşitul păstrării, activitatea ei devine aproape nulă la primele două momente, pe cînd la celelalte două păstrează încă valori însemnate. Scăderea continuă a activităţii $PfO_{4,94}$ din momentul climacteric (începutul procesului de maturare), cînd fructele erau încă pe pom, pînă la sfîrşitul lunii ianuarie — începutul lunii februarie, de cînd aceasta creşte din nou, indică — după părerea noastră, sfîrşitul procesului de maturare. Faptul se corelează şi cu alte date ale noastre (necomunicate) asupra metabolismului zaharurilor : în merele Jonathan continuă creşterea cantităţii de zaharuri simple (zahăr invertit), în timpul păstrării lor, pînă în luna februarie.

Tot în această perioadă, soiul Jonathan se manifestă diferit de Starking în privinţa conţinutului de substanţe înalt energetice : la sfîrşitul păstrării merele Jonathan III şi IV nu mai conţin nici o urmă din acestea, avînd, în schimb, o cantitate mai mare decît I şi II din substanţele slab energetice (iod) ; merele Starking le conţin încă în cantităţi notabile pe cele înalt energetice. Poate că lipsa totală a acestora la Jonathan III şi IV să explice gradul crescut de degradare a merelor respective.

Din punct de vedere practic, cel mai bine s-au păstrat merele recoltate în momentele II şi I (Jonathan) şi I şi II (Starking), avînd pierderile cele mai mici. Urmează, deci, că rămînerea fructelor pe pom mai mult de 150 de zile le aduce în situaţia depăşirii unui anumit stadiu al maturităţii lor, incipient, care să le permită continuarea lentă a maturării, în perioada păstrării, într-un timp suficient de lung de la recoltare. Această concluzie coincide cu a altor autori [7], care au găsit pentru merele Golden Delicious ca moment optim de recoltare vîrsta fructului pe pom de 145 — 155 de zile. De altfel, însuşi ritmul creşterii fructelor arată, după datele noastre, că după 150 de zile acesta este destul de mic ca să mai justifice rămînerea lor pe pom. Desigur, vîrsta fructelor, în zile, nu poate reprezenta un indice riguros, ci numai orientativ, maturarea fructelor fiind o funcţie de condiţii

climatice, în primul rînd ; or, acestea diferă de la an la an. Ea poate, însă, indica momentul începerii celor cîtorva determinări biochimice care marchează schimbări ale metabolismului, corelate cu gradul de maturitate al fructului, ce interesează păstrarea.

CONCLUZII

Indiferent de deosebirile dintre cele două soiuri studiate, din momentul atingerii vîrstei fructelor pe pom de circa 150 de zile, ritmul creşterii lor scade mai mult sau mai puţin brusc. Pînă în acest moment scade continuu conţinutul de substanţe oxidabile cu iod ($E_0 = 0{,}62$ V) şi cu permanganat de potasiu ($E_0 = 1{,}51$ V), ca şi activitatea polifenoloxidazei.

O dată cu această vîrstă, în fruct creşte brusc conţinutul substanţelor slab energetice (oxidabile cu iod) şi activitatea polifenoloxidazei (corelaţie pozitivă între acestea), iar conţinutul substanţelor înalt energetice (oxidabile cu permanganat) rămîne practic constant. Momentul pare să marcheze stadiul „preclimacteric" al dezvoltării fructului.

Momentul cel mai potrivit pentru recoltarea merelor şi introducerea lor în siloz este cel în care creşte brusc activitatea polifenoloxidazei şi scade — la fel de brusc — cea a peroxidazei, paralel cu creşterea oxidabilităţii cu iod şi cu menţinerea practic constantă a oxidabilităţii cu permanganat de potasiu.

Prezentată la redacţie la 17 februarie 1971

Institutul de cercetări pentru pomicultură.
Staţiunea experimentală pomicolă „Voineşti".
Judeţul Dîmboviţa

BIBLIOGRAFIE

1. Batram, R. D., W. Fruit Grower, Ser. A, **20**, 13 (1966).
2. Blanpied, G. D., Proc. Amer. Soc., hortic. Sci., **88**, 33 (1966).
3. Durić B., Poljopr. Novi Sad, **15**, 667 (1967) (Plant breed. abstr., **38** — 3248).
4. Hilkenbäumer , F., Mitt. Rebe. Wein Obstbau Früchteverw., XVI, 384 (1966).
5. Iliescu El., St. Cerc. biochim., **12**, 47 (1969).
6. Kretchman, D. W., Ann. Meeting Ohio State hortic. Sci., 108 (1967) (Plant breed, abstr., **38** — 3222).
7. Olsen, K. L., Proc. Amer. Soc. hort. Sci., **91**, 821 (1967).
8. Sapojnikova, E. V., Biohim. Plod. i Obosci., **4**, 88 (1958).

ASPECTS OF THE REDUCING-OXIDING METABOLISM IN APPLES DURING THEIR GROWTH, MATURATION AND STORAGE

SUMMARY

The metabolism of Jonathan and Starking apples as expressed by polyphenoloxidase and peroxidase activities (at pH 4.94 and 7.17) and by I_2 ($E_0 = 0.62$ V) and $KMnO_4$ ($E_0 = 1.51$ V) oxidable compound content

has been studied. The fruits were harvested at ages of 137, 150, 165 and 175 days and stored at 0°C during seven months.

It has been concluded that the best moment for the harvesting is at the age of 140—150 days, when a sharp growth of the polyphenoloxidase activity and of iodine oxidability occurs, as well as a lower peroxidase activity (pH 4.94) and a constant oxidability with $KMnO_4$.

The apples harvested at age of 140 — 150 days presented the least degradations during the storage.

ST. CERC. BIOCHIMIE, 14, 4, 395–404 (1971)

DISTRIBUȚIA RIBONUCLEAZEI ACIDE PE FRACȚIUNILE SUBCELULARE OBȚINUTE DIN MUȘCHII STRIAȚI AI UNOR VERTEBRATE

CORINA IORDACHE

Rezumat. — S-a cercetat activitatea ribonucleazică (RN-azică) acidă, liberă, totală și legată a fracțiunilor subcelulare izolate la 800 g(N), 8 500 g (M) și 14 000 g (L), din mușchii proveniți de la diferite clase de vertebrate (amfibii, reptile, păsări și mamifere). S-a constatat că activitatea RN-azei acide libere și totale este repartizată pe toate cele trei fracțiuni subcelulare izolate, cea mai scăzută activitate fiind prezentată de fracțiunea N. La nivelul celorlalte două fracțiuni subcelulare, M și L, se remarcă cea mai scăzută activitate pentru clasa amfibiilor și păsărilor, iar cea mai crescută — pentru clasa reptilelor și a mamiferelor. Fracțiunea subcelulară L leagă diferit enzima, după clasa de vertebrate de la care provin mușchii. Activitatea specifică relativă a RN-azei acide a fracțiunii subcelulare N este scăzută și practic aceeași pentru mușchii tuturor vertebratelor examinate; cea a fracțiunii subcelulare M este crescută pentru amfibii și reptile, scăzută pentru păsări și intermediară pentru mamifere; cea a fracțiunii subcelulare L este evident mai crescută pentru mușchii tuturor vertebratelor examinate, creșterea fiind în raport cu evoluția lor filogenetică. Activitatea ribonucleazei acide a fracțiunii subcelulare L evidențiază deosebirile la nivel enzimatic dintre mușchii unor vertebrate, în funcție de specie, respectiv de treapta evolutivă.

Lizozomii, particule citoplasmatice care intervin în unele procese metabolice ale celulei vii, au fost identificați în organismele unicelulare, la nevertebrate și în celulele provenite din principalele organe ale vertebratelor (ficat, splină, rinichi, creier, pancreas etc.) [1]. Din punct de vedere biochimic, lizozomii se caracterizează prin conținutul lor în hidrolaze acide. Activitatea acestora se manifestă, cu deosebire, după eliberarea lor din particule, sub acțiunea unor factori fizici sau chimici, sau în anumite stări patologice.

Controversa privind existența lizozomilor în mușchi a fost rezolvată pozitiv în ultimii ani și s-a arătat că, din seria hidrolazelor acide, țesutul muscular posedă în cantitate mai mare catepsina și ribonucleaza acidă [2], [3]. În afara lucrărilor lui Zalkin și colab. [4], Tappel și colab. [5], Shibko și Tappel [6], care au studiat raporturile dintre creșterea activității ribonucleazei acide lizozomiale și distrofia musculară, menționăm cercetările efectuate de Romeo și colab. [7], Stagni și de Bernard [8], care au studiat distribuția enzimei pe fracțiunile subcelulare obținute din inimă de bou și mușchi de șobolan.

Ribonucleaza (RN-aza) s-a dovedit a fi o enzimă la care s-au constatat asemănări şi diferenţe structurale după originea speciilor animale din care a fost extrasă [9]. Într-o lucrare anterioară [10] am arătat că şi RN-aza din muşchi prezintă o creştere a activităţii specifice, corespunzător evoluţiei vertebratelor pe scară filogenetică.

Avînd în vedere că formaţiunea subcelulară pe care se găseşte fixată RN-aza acidă este prezentă în întreg filum-ul animal, iar gradul de activitate al unei enzime faţă de substrat poate fi utilizat drept indice în elaborarea unei taxonomii biochimice [11], am considerat că cercetarea distribuţiei RN-azei acide din muşchii unor vertebrate, în contextul premiselor expuse mai sus, ar putea oferi unele informaţii suplimentare interesante.

În lucrarea de faţă se expun rezultatele cercetărilor noastre cu privire la activitatea acestei enzime din fracţiunile subcelulare separate din omogenatele muşchilor unor vertebrate situate pe diferite trepte de evoluţie filogenetică. Concluziile rezultate au permis stabilirea unor corelaţii între distribuţia RN-azei acide pe anumite fracţiuni subcelulare şi evoluţia biologică a speciilor de vertebrate examinate.

MATERIAL ŞI METODE

S-au folosit muşchii striaţi scheletici proveniţi de la următoarele clase de vertebrate : amfibii, reptile, păsări şi mamifere (broască, broască ţestoasă, şarpe, porumbel, şobolan şi iepure).

Ţesutul muscular, prelevat imediat după sacrificarea animalului, a fost spălat în soluţie fiziologică, mărunţit şi cîntărit. Omogenizarea s-a efectuat cu ajutorul unui omogenizator Typ 302 (Polonia), timp de 60 s, în soluţie de zaharoză 0,25 M la care s-a adăugat KCl 50 mM (raport de extracţie 1 : 4). Suspensia obţinută a fost filtrată prin 4 straturi de nylon şi apoi adusă la pH 7,4 prin adăugarea de KOH 4 N. Extractul celular a fost apoi centrifugat după schema dată de Stagni şi de Bernard [8]. Depozitul obţinut la 800 g (10 min) a fost considerat drept fracţiune nucleară (N), cel de la 8 500 g (10 min) drept fracţiune mitocondrială (M), iar cel de la 14 000g (20 min) drept fracţiune postmitocondrială (lizozomală L).

Toate operaţiunile de fracţionare s-au făcut la rece (+4°C).

Activitatea ribonucleazei acide (EC 2.7.7.17) a 0,5 ml suspensie de particule în zaharoză 0,25 M a fost determinată după indicaţiile lui Romeo şi colab. [7]. S-a folosit soluţie tampon de acid acetic-acetat de sodiu, pH = 5,0. Concentraţia finală a ARN a fost de 0,1%, iar incubarea cu substrat s-a făcut timp de o oră, la 37°C.

Activitatea RN-azică „liberă" s-a considerat cea manifestată de fracţiunile subcelulare ca atare, în prezenţa substratului.

Activitatea RN-azică „totală" s-a considerat cea manifestată de fracţiunile subcelulare după tratarea suspensiilor respective cu Triton X-100 (concentraţie finală 0,1% v/v), timp de 30 min, prin agitare mecanică (100 oscilaţii/min, 25°C).

Activitatea RN-azică „legată" a reieşit din diferenţele dintre activitatea RN-azică „totală" şi cea „liberă".

Absorbţia oligonucleotidelor acidosolubile s-a citit la un spectrofotometru VSU-2 la 260 nm, cuva 1,0 cm.

Concentrația proteică a suspensiilor de particule în zaharoză 0,25 M s-a determinat prin metoda Aldridge [12] și Miller [13].

S-au folosit ARN (Kepec, Siegburg) și Triton X-100 (Serva).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În tabela 1 sînt redate valorile obținute în cazul determinărilor de activitate RN-azică „liberă", la cele trei fracțiuni separate (800 g, 8 500 g și 14 000 g).

Din examinarea tabelei se constată că pentru fracțiunea de la 800 g (N), cea mai scăzută activitate specifică apare la broască, iar cea mai ridicată la broasca țestoasă și șarpe. Valorile obținute pentru mușchiul de porumbel, șobolan și iepure ocupă o poziție intermediară și sînt de același ordin de mărime.

Din compararea statistică a valorilor obținute reiese că activitatea RN-azică a fracțiunii 800 g obținute din mușchi de broască se deosebește de toate celelalte (în afară de cea din mușchi de porumbel), iar cea de la broasca țestoasă se deosebește de cea de la porumbel, șobolan și iepure.

Privind datele obținute pentru fracțiunea de la 8 500 g (M), se poate constata că cea mai scăzută activitate o prezintă mușchiul de porumbel, iar cea mai crescută mușchiul de broască țestoasă și șarpe. Valorile obținute pentru mușchiul de broască se deosebesc de cele obținute pentru mușchiul de broască țestoasă, șarpe și șobolan; valorile pentru broasca țestoasă se deosebesc de cele pentru porumbel, șobolan și iepure; valorile pentru șarpe se deosebesc de cele pentru porumbel și iepure, iar cele pentru porumbel se deosebesc de șobolan și iepure. În concluzie, fracțiunea obținută la 8 500 g (M) arată că activitatea sa RN-azică este diferită, în funcție de clasa de vertebrate de la care provin mușchii.

Pentru fracțiunea separată la 14 000 g (L), valorile înscrise în tabela 1 arată că activitatea RN-azică cea mai redusă se manifestă la broască și porumbel, iar cea mai intensă se constată la broasca țestoasă, șarpe și iepure. Și aici se observă că activitatea RN-azică a fracțiunii obținute din mușchiul de broască, broască țestoasă și șarpe se deosebește de a celorlalte vertebrate. Pentru mușchiul de porumbel avem valori medii scăzute iar valorile pentru șobolan și iepure sînt practic egale. Deci și activitatea acestei fracțiuni permite să se facă unele distincții între diferiții reprezentanți ai unor clase de vertebrate: reptilele au o activitate RN-azică marcată, amfibiile și păsările au o activitate scăzută, iar mamiferele ocupă o poziție intermediară.

Supunînd suspensiile N, M și L, obținute prin fracționare, acțiunii detergentului Triton X-100, care s-a dovedit a fi foarte eficace și fără influență asupra activității RN-azei [8], [14], s-a realizat eliberarea enzimei și s-a determinat activitatea RN-azică totală.

Din examinarea valorilor expuse în tabela 2 se desprinde clar concluzia că Triton X-100 activează enzima prin eliberarea ei din structurile celulare (pentru comparare, vezi tabela 1). Se confirmă deci, încă o dată, constatarea semnalată de autorii care au întrebuințat același detergent [2], [4], [5], [7], [8], [14].

Tabela 1

Distribuția activității specifice a ribonucleazei acide libere pe fracțiunile subcelulare obținute din mușchii scheletici ai unor vertebrate

(Activitatea specifică a 0,5 ml suspensie $E^{10}_{260_{nm}}$ / mg proteină: valori medii obținute din 4–6 determinări; cifrele din paranteze indică diferențele limită semnificative $DL_{0,05}$

Clase / Specii	Fracțiuni	Valori medii	Diferențe ($DL_{0,05}$)				
Amfibii	N	1,13	—				
	M	3,78	—				
BROASCĂ	L	5,56	—				
Reptile	N	4,05	2,92(1,40)	—			
	M	14,65	10,87(5,28)	—			
BROASCĂ ȚESTOASĂ	L	18,10	12,54(5,32)	—			
	N	3,07	1,94(1,12)	0,98(1,44)	—		
	M	11,80	8,02(4,24)	2,85(5,47)	—		
ȘARPE	L	15,50	9,94(4,26)	2,60(5,44)	—		
Păsări	N	2,35	1,22(1,05)	1,70(1,40)	0,72(1,12)	—	
	M	2,28	1,50(4,24)	12,37(5,47)	9,52(4,47)	—	
PORUMBEL	L	5,51	0,05	12,59(5,32)	9,99(4,26)	—	
Mamifere	N	2,07	0,94(1,12)	1,98(1,44)	1,00(1,18)	0,28(1,12)	—
ȘOBOLAN	M	7,80	4,02(3,99)	6,85(5,28)	4,00(4,24)	5,52(4,24)	—
	L	9,10	3,54(4,01)	9,00(5,32)	6,40(4,26)	3,59(4,01)	—
	N	2,21	1,08(1,00)	1,84(1,36)	0,86(1,07)	0,14(1,00)	0,14(1,00)
	M	6,52	2,74(3,99)	8,13(5,28)	5,28(4,24)	4,24(4,24)	1,28(4,24)
IEPURE	L	10,16	4,60(4,01)	7,94(5,32)	5,34(4,26)	4,65(4,01)	1,06(4,01)

Tabela 2

Distribuția activității specifice a ribonucleazei acide totale pe fracțiunile subcelulare obținute din mușchii scheletici ai unor vertebrate

(Activitatea specifică a 0,5 ml suspensie $E_{260\ nm}^{1.0\ cm}$ / mg proteină; valori medii obținute din 4—6 determinări; cifrele din paranteze indică diferențele limită semnificative $DL_{0,05}$).

Clase / Specii	Fracțiuni	Valori medii	Diferențe ($DL_{0.05}$)				
Amfibii — BROASCĂ	N	1,68	—				
	M	6,37	—				
	L	9,85	—				
Reptile — BROASCĂ ȚESTOASĂ	N	5,05	2,37(2,23)	—			
	M	18,50	12,13(6,77)	—			
	L	28,60	18,75(13,81)	—			
ȘARPE	N	3,62	2,02(1,79)	1,43(2,29)	—		
	M	16,97	10,60(5,41)	1,53(7,00)	—		
	L	21,92	12,07(11,07)	6,68(14,28)	—		
Păsări — PORUMBEL	N	2,97	1,29(1,68)	2,08(2,23)	0,65(1,78)	—	
	M	2,69	3,68(5,41)	15,81(7,00)	14,28(5,72)	—	
	L	7,82	2,03(10,45)	20,78(13,87)	14,10(11,07)	—	
Mamifere — ȘOBOLAN	N	2,64	0,96(1,79)	2,41(2,29)	0,98(1,88)	0,33(1,78)	—
	M	10,02	3,65(5,12)	8,48(6,77)	6,95(5,41)	7,33(5,41)	—
	L	17,42	7,57(10,45)	11,18(13,81)	4,50(11,07)	9,60(10,45)	—
IEPURE	N	2,66	1,98(1,60)	1,39(2,15)	0,04	0,69(1,58)	1,02(1,68)
	M	8,44	2,07(5,12)	10,06(6,77)	8,53(5,41)	5,75(5,41)	1,58(2,45)
	L	24,10	14,25(10,45)	4,50(13,81)	2,18(11,07)	16,28(10,46)	6,68(10,45)

Comparînd valorile activităţii specifice totale RN-azice a fracţiunilor celulare separate la 800 g (N) se constată că muşchiul de broască prezintă cea mai scăzută activitate faţă de cel de broască ţestoasă a cărui activitate este cea mai ridicată. Activitatea RN-azică a fracţiunii N din muşchiul de broască se deosebeşte numai de cea a muşchiului de broască ţestoasă, şarpe şi iepure, iar cea a muşchiului de broască ţestoasă se deosebeşte numai de muşchiul de broască şi de şobolan.

Iată deci că, prin compararea activităţii specifice totale a RN-azei provenite din fracţiunea de la 800 g (N), avem posibilitatea să facem unele distincţii între amfibii şi reptile sau între reptile şi mamifere. Reprezentantul clasei păsărilor, porumbelul ocupă o poziţie intermediară între reptile şi mamifere.

Activitatea specifică a RN-azei totale provenite din fracţiunea separată la 8 500 g (M) este mult mai evidentă la muşchiul de broască ţestoasă şi şarpe, faţă de activitatea scăzută a muşchiului de porumbel sau de broască. Din examinarea valorilor se poate desprinde concluzia netă că activitatea enzimatică a fracţiunii M a muşchiului de broască se distinge de aceea a reptilelor (broască ţestoasă, şarpe) care, la rîndul ei, se deosebeşte de păsări (porumbel) şi mamifere (şobolan, iepure). Activitatea fracţiunii obţinute din muşchiul de porumbel are o poziţie aparte faţă de toate celelalte vertebrate.

În fine, activitatea specifică totală a fracţiunii separate la 14 000 g (L) este foarte crescută la muşchiul de broască ţestoasă şi scăzută la muşchiul de porumbel. Se remarcă, deci, o activitate RN-azică deosebită la reprezentanţii clasei reptilelor (broască ţestoasă, şarpe) şi clasei mamiferelor (şobolan, iepure), între care nu avem deosebiri semnificative. Reprezentantul clasei păsărilor (porumbel) se distinge de toate celelalte vertebrate.

În tabela 3 am expus valorile privind activitatea RN-azică acidă „legată", care reprezintă diferenţele dintre activitatea RN-azică totală şi cea liberă.

Din examinarea acestei tabele reiese în evidenţă constatarea că RN-aza acidă se fixează cu precădere pe fracţiunile subcelulare separate la 8 500 g şi, în special, la 14 000 g. Fracţiunea de la 800 g fixează, în general, o cantitate mică de enzimă, fapt care nu permite aprecieri cantitative comparative între muşchi. Tabela 3 arată însă, pentru celelalte două fracţiuni (M şi L), că se pot face unele distincţii interesante privind procentul de RN-ază acidă „legată" de particule. Referindu-ne în special la fracţiunea subcelulară L, se poate remarca faptul că această fixare se face diferit, în funcţie de clasa vertebratelor de la care provine muşchiul analizat. La amfibii (broască), peste 40% din activitate este legată; la reptile şi păsări (broască ţestoasă, şarpe, porumbel), acest procent scade (36,7%—29%); la mamifere (şobolan, iepure) apare evidentă tendinţa mai mare de fixare a enzimei (47,7% — 57,8%). Avînd în vedere diferenţele semnalate mai sus, credem că această „legare" diferită a RN-azei acide pe membranele particulelor izolate la 14 000 g poate servi drept punct de plecare în evidenţierea unor calităţi deosebite ale acestor membrane, în funcţie de originea de specie a muşchiului. Se ştie că aceste membrane, de natură lipoproteică, acţionează fie ca o barieră între moleculele enzimei şi substratul respectiv, fie ca inhibitori ai centrilor activi ai enzimei [15]. Proteinele care intră în asemenea structuri sînt, se pare, genetic determinate şi au anumite

Tabela 3

Activitatea specifică a ribonucleazei acide „legate" de fracţiunile subcelulare obţinute din muşchii scheletici ai unor vertebrate

(Activitatea specifică a 0,5 ml suspensie $E\ \frac{1,0\ cm}{260\ nm}$/mg proteină; cifrele din paranteze indică diferenţele limită semnificative $DL_{0,05}$).

Clase / Specii	Fracţiuni	Valori medii		Act. legată	Legată % faţă de act. totală
		act. totală	act. liberă		
Amfibii	N	1,68	1,13	0,55(0,13)	32
BROASCĂ	M	6,37	3,78	2,59(1,89)	40
	L	9,85	5,56	4,29(3,41)	43,5
Reptile	N	5,05	4,05	1,00(2,54)	19
BROASCĂ ŢESTOASĂ	M	18,50	14,65	3,85(6,30)	20
	L	28,60	18,10	10,50(6,35)	36,7
ŞARPE	N	3,62	3,07	0,55(0,95)	15
	M	16,97	11,80	5,17(3,68)	30
	L	21,92	15,50	6,42(2,25)	29
Păsări	N	2,97	2,35	0,62(0,44)	20
PORUMBEL	M	2,69	2,26	0,41(0,38)	15
	L	7,82	5,51	2,31(2,22)	29,5
Mamifere	N	2,64	2,07	0,57(0,60)	21
ŞOBOLAN	M	10,02	0,80	2,22(1,47)	22
	L	17,42	9,10	8,32(6,97)	47,7
	N	3,66	2,21	1,45(1,18)	39
IEPURE	M	8,44	6,52	1,92(1,30)	22
	L	21,10	10,16	13,94(10,00)	57,8

proprietăţi [16]. De altfel, cercetări recente [17] au arătat că în timpul procesului de îmbătrînire, membrana lizozomială suferă anumite transformări care se reflectă în comportarea enzimei. Este prematur să ne pronunţăm asupra importanţei şi semnificaţiei acestor constatări experimentale, dar ne propunem să lărgim pe viitor gama unor astfel de cercetări.

Calcularea activităţii specifice relative totale (definită ca fiind raportul dintre activitatea specifică a fiecărei fracţiuni şi activitatea specifică a sumei fracţiunilor) a permis aprecierea repartiţiei activităţii RN-azei acide pe cele trei fracţiuni obţinute (N, M şi L) (fig. 1).

Din examinarea figurii 1 se constată că activitatea specifică relativă a fracţiunii izolate la 800 g (N) este practic aceeaşi pentru toţi muşchii analizaţi (0,085 — 0,101), cu excepţia celui de porumbel (0,22). Activitatea specifică relativă a fracţiunii izolate la 8 500 g (M) este mult mai evidentă pentru muşchii proveniţi de la amfibii şi reptile (0,35 — 0,39), este scăzută pentru muşchiul de pasăre (0,20) şi intermediară pentru muşchii de la mamifere (0,23 — 0,33). Activitatea specifică relativă a fracţiunii izolate la 14 000 g (L) este evident mai crescută pentru toţi muşchii cercetaţi, diferenţîndu-se trei trepte de valori : amfibiile şi reptilele (0,51 — 0,55) ; păsările (0,57) şi mamiferele (0,57 — 0,66).

Raporturile cantitative care au reieşit din calcularea activităţii specifice relative a celor trei fracţiuni subcelulare izolate, relevă, în primă

aproximaţie, deosebirile care există între muşchii vertebratelor cercetate, în funcţie de specie, respectiv de dreapta evolutivă.

Unele date prezentate în această lucrare, referitoare la activitatea scăzută a RN-azei acide din muşchiul de broască sau cel de porumbel, apar semnificative în lumina unor lucrări din literatură. Astfel, cercetări privind filogenia inhibitorului natural al RN-azei alcaline din ficatul unor

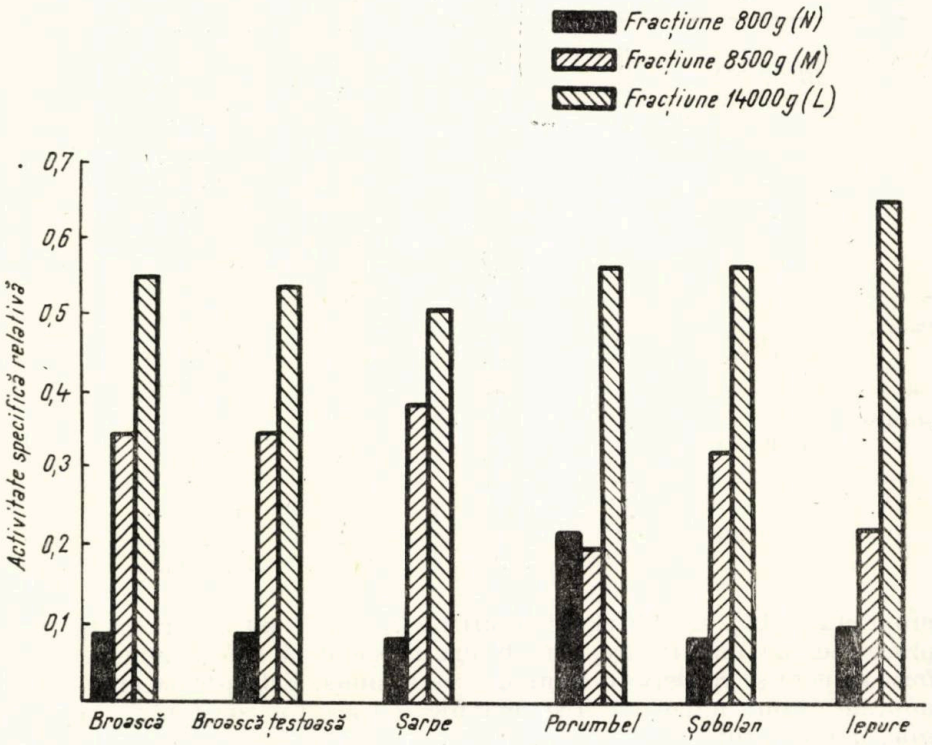


Fig. 1. — Distribuţia activităţii ribonucleazei acide pe fracţiunile subcelulare N, M şi L obţinute din muşchii vertebratelor. Activitatea specifică relativă = *activitatea specifică a fiecărei fracţiuni* / activitatea specifică a sumei fracţiunilor.

vertebrate, au arătat că acest inhibitor nu apare la broască sau pasăre [18], [19]. De asemenea, Kaminski [11] a constatat că unele diferenţe care apar în studiul comparativ al unor esteraze serice la păsări pot corespunde poziţiei filogenetice a păsărilor în raport cu mamiferele. În această ordine de idei există şi remarca făcută de Şerban şi Cotariu [20], că repartiţia izoenzimelor lactico-dehidrogenazei la pasăre este total diferită în comparaţie cu cea de la mamifere.

Analiza rezultatelor expuse în această lucrare şi integrarea lor în contextul datelor existente în literatură, arată că cercetările ulterioare pot aduce noi dovezi privind relaţiile dintre evoluţia moleculară la nivelul proteinelor enzimatic active şi cea biologică.

CONCLUZII

1. Activitatea RN-azei acide, libere şi totale, este repartizată pe toate cele trei fracţiuni subcelulare izolate, cea mai scăzută activitate fiind prezentată de fracţiunea N. La nivelul celorlalte două fracţiuni subcelulare M şi L, cea mai scăzută activitate s-a constatat pentru clasa amfibiilor şi păsărilor, iar cea mai crescută pentru clasa reptilelor şi mamiferelor.

2. Fracţiunea subcelulară L leagă diferit enzima, după clasa de vertebrate de la care provin muşchii.

3. Activitatea specifică relativă a fracţiunii subcelulare N este scăzută şi practic aceeaşi pentru muşchii tuturor vertebratelor examinate. Cea a fracţiunii subcelulare M este crescută pentru amfibii şi reptile, scăzută pentru păsări şi intermediară pentru mamifere. Cea a fracţiunii subcelulare L este evident mai crescută pentru muşchii tuturor vertebratelor examinate, creşterea fiind în raport cu evoluţia lor filogenetică.

4. Distribuţia RN-azei acide se face diferit pe fracţiunile subcelulare obţinute din muşchii tuturor vertebratelor examinate. Determinarea activităţii prezente în fracţiunea L permite evidenţierea deosebirilor la nivel enzimatic dintre muşchii unor vertebrate, în funcţie de specie, respectiv de treapta evolutivă.

Prezentată la redacţie la 16 iulie 1971 *Institutul de biochimie, Bucureşti*

BIBLIOGRAFIE

1. G. Weissmann, New Engl. J. of Med., **273**, 1084 (1965).
2. S. Shibko, K. A. Caldwell, P. L. Sawant, A. L. Tappel, J. Cell. Comp. Physiol., **61**, 85 (1963).
3. S. Shibko, A. L. Tappel, Biochem., J., **89**, 33 P (1963)
4. H. Zalkin, A. L. Tappel, K. A. Caldwel , S. Shibko, I. D. Desai, T. A. Holliday, J. biol. Chem., **237**, 2678 (1962).
5. A. L. Tappel, H. Zalkin, K. A. Caldwell, I. D. Desai, S. Shibko, Arch. Biochem. Biophys., **96**, 340 (1962).
6. S. Shibko, A. L. Tappel. Fed. Proc., Abstr., **23**, 842 (1964).
7. D. Romeo, N. Stagni, G. L. Sottocasa, M. G. Pugliarelo, B. de Bernard, F. Vittur, Biochim. Biophys. Acta, **130**, 64 (1966).
8. N. Stagni, B. de Bernard, Biochim. Biophys. Acta, **170**, 129 (1968).
9. A. Vegotsky, S. W. Fox, *Protein molecules: intraspecific and intraspecific variations, în Comparative Biochemistry*, ed. M. Florkin, H. S. Mason, vol. 4, Academic Press, New York — Londra, 1962, p. 203.
10. C. Iordache, St. cerc. biochim., **14**, 49 (1971).
11. M. Kaminski, *Étude comparative des estérases sériques chez quelques especes d'oiseaux*, în *Protides on the biological fluids, Proceedings of the 12th Coloquium*, Bruges, 1964, Edited by H. Peeters, Elsevier Publ. Comp. Amsterdam, Londra, New York, 1965, p. 143.
12. W. N. Aldridge, Biochem. J. , **67**, 423 (1957).
13. G. L. Miller, Analyt. Chemistry, **31**, 964 (1959).
14. R. Wattiaux, C. de Duve, Biochem., J., **63**, 606 (1956).
15. D. Romeo, M. C., Pugliarello, B. de Bernard, Ital. J. Biochem., **XIII**, 353 (1964).
16. K. D. Munkres, *Evolution of enzymes locational specificity: models in microbial genetics*, în *Homologous enzymes and biochemical evolution*, A colloquium organized under the auspices of advanced study group of NATO, Editors Nguyen van Thoai and Jean Roche, Gordon and Breach Science Publishers, New York — Londra — — Paris, 1968, p. 119.

17. Sataro Goto, Tatsuya Takano, Denichi Mizuno, Tateshi Nakano, Kiyoshi Imaizumi, J. Gerontol., **24**, 305 (1969).
18. J. S. Roth, Biochim. Biophys. Acta, **61**, 903 (1962).
19. N. Kraft, K. Shortman, Aust. J. biol., Sci., **23**, 175 (1970).
20. M. Şerban, D. Cotariu, St. cerc. biochim., **12**, 173 (1969).

DISTRIBUTION OF ACID RIBONUCLEASE ON THE SUBCELLULAR FRACTIONS FROM SKELETAL MUSCLES OF VERTEBRATES

SUMMARY

Free, total and bound acid ribonuclease activities (RN-ase) were studied in subcellular fractions isolated at 800 × g (N), 8 500 × g (M) and 14 000 × g (L), from skeletal muscles originating in different vertebrate species (amphibia, reptiles, birds and mammals).

Free and total acid RN-ase activities are distributed on all subcellular fractions, the N fraction displaying the lowest activity. As far as M and L subcellular fractions are concerned, the lowest activity was found in amphibia and birds while the highest, in reptiles and mammals.

According to the vertebrate class, muscles come from, the enzyme is differentily bound by L subcellular fraction. Specific relative activity of acid RN-ase of the N subcellular fraction is low and virtually similar in all investigated muscles; that of M subcellular fraction is increased in amphibia and reptiles, low in birds, and intermediate in mammals; that of L subcelullar fraction is obviously increased in all vertebrate muscles, the increase being related to their phylogenetic evolution.

Acid ribonuclease activity of muscle L subcellular fraction exhibits differences in terms of vertebrate species and evolutionary degree, respectively.

ST. CERC. BIOCHIMIE, 14, 4, 405–408 (1971)

ELIBERAREA ZAHARURILOR HIDROSOLUBILE ŞI A APEI DIN BIOSTRUCTURA FRUNZELOR DE VARZĂ ŞI A FRUCTELOR DE MĂR ŞI PĂR PREÎNCĂLZITE LA TEMPERATURI DIFERITE

ANGELA MIHĂESCU

Rezumat. — Preîncălzirea frunzelor de varză şi a fructelor de măr şi păr duce la destrămarea mai mult sau mai puţin înaintată a materiei lor biostructurate cu eliberarea de zaharuri hidrosolubile şi de apă.

După ce au fost supuse acţiunii temperaturilor ridicate, plantele prezintă modificări ale biochimismului, care se repercutează asupra stării şi comportării lor fiziologice. Mecanismul acestor modificări încă nu este lămurit, totuşi unele cercetări arată că un rol însemnat revine materiei biostructurate [1]. Sub acţiunea temperaturilor ridicate şi în funcţie de împrejurări, această materie se destramă fie parţial, plantele rămînînd vii, fie total, plantele fiind omorîte. Cum prin destrămarea materiei biostructurate se eliberează componentele din care ea este alcătuită, se înţelege că cercetarea naturii şi cantităţii componentelor eliberate, precum şi stabilirea influenţei lor asupra biochimismului plantei, pot contribui la dezlegarea diferitelor aspecte ale problemei rezistenţei plantelor la căldură.

În una din lucrările anterioare s-a constatat că materia biostructurată a ţesutului foliar conţine zaharuri [2]. Înseamnă că urmărind eliberarea zaharurilor din materia biostructurată a ţesuturilor vegetale preîncălzite la temperaturi diferite s-ar putea stabili modul de comportare a acestei materii în condiţiile menţionate. În consecinţă, am efectuat unele cercetări pe frunze de varză şi le-am extins apoi asupra fructelor de măr şi păr, aplicînd metoda stoarcerii materialului vegetal la presiuni hidrostatice ridicate [3].

MATERIAL ŞI METODE DE LUCRU

Am lucrat pe frunze de varză albă (*Brassica oleracea* var. *capitata* D. c.f. *alba*), detaşate de pe căpăţîni, şi pe fructe de măr (*Malus domestica*) şi păr (*Pirus sativa*) ajunse la maturitate de consum.

Frunzele de varză se tăiau de-a lungul nervurii principale, (nervura se arunca), jumătăţile din dreapta erau folosite ca martor, iar cele din stînga erau supuse preîncălzirii la temperaturi diferite. În total se alcătuiau patru perechi de probe, fiecare probă cîntărind 50 g.

Fructele se tăiau în cîte 5 segmente egale şi se alcătuiau 5 probe de cîte 100 g, folosind pentru fiecare probă cîte un segment de la mai multe fructe din aceeaşi specie.

Probele martor se păstrau la temperatura ambiantă (20 — 24°C), iar celelalte se introduceau în vase care se astupau ermetic, se cufundau în băi marine şi apoi se încălzeau timp de o oră la temperaturile de 40, 60 şi 100°C. După răcire la temperatura ambiantă, toate probele se storceau pe rînd pentru obţinerea sucurilor respective. Stoarcerea se realiza cu o presă hidraulică manuală, tip Hafico, model 2 l. Presiunea se ridica lent şi se menţinea la 150 atm în cazul fructelor, respectiv la 300 atm în cazul frunzelor de varză.

După măsurarea volumului (cu cilindru gradat), sucurile obţinute se centrifugau timp de 20 min pentru sedimentarea eventualelor particule suspendate, apoi se trecea la determinarea concentraţiei lor în zaharuri hidrosolubile reducătoare şi totale, folosind metoda Somogy [4], modificată de Nelson [5] şi exprimînd rezultatele, convenţional şi global, în grame glucoză la 100 ml suc. Pentru identificarea zaharurilor prezente în aceste sucuri am recurs la cromatografia pe hîrtie, după procedeul preconizat de Jucovitzki şi colab. [6].

REZULTATELE OBŢINUTE ŞI SEMNIFICAŢIA LOR

Din datele cuprinse în tabelă se constată următoarele:

Preîncălzirea frunzelor de varză şi a fructelor de măr şi păr determină o creştere a volumului de suc stors. Această creştere se manifestă chiar după preîncălzirea la 40°C şi se accentuează mai mult după preîncălzirea la 60°C. Ridicarea temperaturii de preîncălzire la 100°C nu mai modifică în măsură mai pronunţată volumul sucului stors, faţă de cel obţinut după preîncălzirea la 60°C.

Atît concentraţia, cît şi cantitatea zaharurilor din sucul stors din frunzele de varză preîncălzite la temperaturi diferite le depăşesc pe acelea din sucul stors din frunzele martor.

În sucurile stoarse din fructele menţionate concentraţia şi cantitatea zaharurilor reducătoare şi totale sînt mai mari decît în sucurile obţinute din frunzele de varză.

Preîncălzirea fructelor de măr şi păr la temperaturile de 40, 60 sau 100°C nu modifică concentraţia în zaharuri reducătoare şi totale a sucurilor stoarse din ele, dar cantitatea globală de zaharuri aflată în sucurile stoarse creşte faţă de aceea din sucurile obţinute din fructele martor, datorită faptului că preîncălzirea măreşte volumul sucului stors.

Toate creşterile menţionate ale concentraţiei sau cantităţii zaharurilor sînt în general cu atît mai pronunţate, cu cît temperatura de preîncălzire a fost mai ridicată.

Faptul că preîncălzirea frunzelor de varză şi a fructelor de măr şi păr duce la mărirea volumului de suc stors şi a cantităţilor de zaharuri aflate în el arată că de la 40°C în sus materia biostructurată începe să se destrame, eliberînd apă şi zaharuri. În cazul frunzelor de varză, în urma preîncălzirii materia biostructurată eliberează zaharurile în proporţie mai mare decît

Tabelă

Concentraţia zaharurilor hidrosolubile reducătoare şi totale (g glucoză/100 ml suc) şi cantitatea globală a acestor zaharuri (g) aflată în sucul obţinut din frunze proaspete de varză albă sau din fructe de măr şi păr, stoarse imediat la temperatura laboratorului sau după preîncălzire la temperaturi diferite

Nr. crt.	Data 1969	t°C	Vol. (ml)	Zaharuri reducătoare		Zaharuri totale	
				conc. g%	cant. g/v	Conc. g%	cant. g/v
			Frunze de varză albă (50 g)				
1	2.12	24	7	2,6	0,18	3,3	0,23
2	2.12	24	5	2,6	0,13	3,0	0,15
3	3.12	40	10	4,2	0,42	4,3	0,43
4	3.12	40	8	4,2	0,33	3,2	0,33
5	4.12	60	26	5,2	1,35	5,5	1,40
6	5.12	60	29	5,4	1,57	5,6	1,62
7	7.12	100	33	4,6	1,52	5,9	1,94
8	7.12	100	32	4,6	1,47	5,8	1,85
			Fructe de măr (100 g)				
1	8.10	23	33	4,6	1,51	5,8	1,91
2	9.10	26	30	4,6	1,38	5,3	1,59
3	14.10	40	35	5,8	2,03	6,1	2,13
4	14.10	40	36	5,3	1,90	5,8	2,10
5	15.10	60	50	4,8	2,40	5,8	2,90
6	16.10	60	57	4,2	2,39	4,7	2,79
7	19.10	100	52	5,0	2,60	5,3	2,75
8	20.10	100	53	5,3	2,80	5,9	3,10
			Fructe de păr (100 g)				
1	25.11	27	23	5,5	1,26	5,6	1,28
2	25.11	27	28	5,6	1,56	5,8	1,62
3	27.11	40	33	5,1	1,68	5,1	1,68
4	28.11	40	35	5,0	1,75	5,5	1,92
5	29.11	60	58	5,5	3,19	5,6	3,24
6	29.11	60	52	5,0	2,60	5,7	2,96
7	30.11	100	46	5,5	2,53	5,8	2,56
8	30.11	100	54	5,9	3,18	6,2	3,34

apa, şi de aceea concentraţia lor în sucuri creşte pe măsură ce preîncălzirea se realizează la o temperatură tot mai ridicată. În cazul fructelor de măr şi păr însă, zaharurile şi apa sînt eliberate cam în aceeaşi proporţie şi de aceea concentraţia zaharurilor în sucuri rămîne practic constantă, indiferent de temperatura de preîncălzire.

Cromatografia a arătat că sucul frunzelor de varză, indiferent dacă acestea au fost sau nu preîncălzite, conţine zaharoză, glucoză şi fructoză. La fructele de măr martor, sucul conţine de asemenea zaharoză, glucoză şi fructoză, pe cînd în sucurile provenite din mere preîncălzite mai apare şi maltoză. La fructele de păr, sucul stors din materialul martor cuprinde zaharoză, glucoză şi fructoză, iar în sucul perelor preîncălzite mai apare şi o pentoză (riboză sau arabinoză). Apariţia maltozei la mere şi a pentozei

la pere poate fi datorită fie eliberării acestor zaharuri din materia biostructurată, fie unor efecte de hidroliză enzimatică a unor compuşi glucidici superiori, realizată în decursul preîncălzirii.

CONCLUZII

Datorită destrămării biostructurii, volumul sucului stors din frunzele de varză şi fructele de măr şi păr preîncălzite la temperaturi diferite şi cantitatea zaharurilor reducătoare şi totale din aceste sucuri sînt cu atît mai mari, cu cît temperatura de preîncălzire a fost mai ridicată.

Sucurile obţinute din material martor conţin zaharoză, glucoză şi fructoză. Preîncălzirea face să mai apară în sucuri maltoza în cazul merelor şi o pentoză în cazul perelor.

Prezentată la redacţie la 22 iulie 1971

Catedra de biochimie, Facultatea de biologie, Universitatea Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. E. Macovschi, A. Mihăescu, St. cerc. biochim., **11**, 337 (1968).
2. E. Macovski, C. Muşolan, Rev. roum. Biochim., **6**, 89 (1969).
3. E. Macovskhi, I. Marineanu, Rev. roum. Biochim., **4**, 235 (1967).
4. M. I. Somogy, J. biol. Chem., **153**, 373 (1944).
5. N. Nelson, J. biol. Chem., **160**, 61 (1945).
6. A. A. Jukovitzki, O. V. Zolotareva, N. M. Sokolov, N. M. Turkeltab, Anal. rom. sov., seria med., **4**, 38 (1952).

THE RELEASE OF HYDROSOLUBLE SUGARS AND WATER FROM BIOSTRUCTURE OF CABBAGE LEAVES AND APPLE AND PEAR FRUITS PRE-HEATED AT DIFFERENT TEMPERATURES

SUMMARY

Preheating of cabbage leaves as well as apple and pear fruits, leads to a more or less advanced breakdown of their biostructured matter with a concomitant release of water and hydrosoluble sugars.

ST. CERC. BIOCHIMIE., 14, 4, 409–417 (1971)

TRANSPORTUL IONILOR DE CLOR ÎNTRE AXONUL GIGANT DE CALMAR ŞI MEDIUL ÎNCONJURĂTOR, ÎN CAZUL ACŢIUNII DNP

FLORENTINA MOSORA

Rezumat. — Analiza teoretică efectuată de pe poziţiile teoriei biostructurii, a rezultatelor experimentale obţinute de Keynes în 1963 [8] privind transportul ionilor de clor între axonul gigant de calmar şi mediul înconjurător, a arătat că scăderea influxului ionilor de clor, observată în timpul acţiunii de durată a inhibitorului metabolic : DNP, nu se datorează „pompei de clor", ci se explică printr-un fenomen de transport pasiv ce ascultă de ecuaţia lui Goldman. Această analiză a fost efectuată ţinînd cont de existenţa potenţialului de repaos al axonului, de prezenţa în axoplasmă a celor trei fracţiuni de apă : liberă (care conţine întreaga cantitate a ionilor de clor), legată şi asimilată (care se poate elibera în cazul destrămării biostructurii), precum şi de activitatea ionilor de clor din apa liberă a axoplasmei şi din mediul exterior.

Cercetările experimentale efectuate de Keynes în 1963 [8] privind transportul ionilor de clor între axonul gigant de calmar şi mediul înconjurător, interpretate în lumina teoriei membranei au arătat că concentraţia ionilor de clor, calculată faţă de conţinutul total de apă al axoplasmei, este de 123 mM/kg H_2O, valoare incompatibilă cu o distribuţie pasivă Nernst a acestor ioni, de o parte şi de alta a membranei. Întrucît valorile coeficienţilor de activitate ai ionilor de clor axoplasmatic, determinate experimental, excludeau posibilitatea legării acestor ioni de coloizii din interiorul axonului, autorul, pentru a explica valoarea concentraţiei obţinute, a presupus existenţa unei „pompe de clor" (necuplată cu „pompa de sodiu-potasiu") ce transportă ionii de clor spre interior, ieşirea din axon făcîndu-se pasiv. În sprijinul presupunerii sale, Keynes a arătat că DNP 0,2 mM înjumătăţea, în decurs de trei ore, influxul clorului marcat.

Deoarece existenţa unei „pompe de clor" făcea, pe de o parte, imposibilă înţelegerea datelor experimentale obţinute atît de Steinbach [16] cît şi de alţi cercetători [5], [1], [2], [3], iar, pe de altă parte, datele lui Keynes nu-şi găseau nici o explicaţie în lumina altor teorii admise pînă în prezent (teoria sorbţiei, ipoteza asociaţiei inducţiei), am întreprins în prezenta lucrare o încercare de a le interpreta de pe poziţiile teoriei biostructurii [9], [10], [11].

Astfel, bazîndu-ne pe postulatele teoriei biostructurii cu privire la apa şi electroliţii celulari şi presupunînd că ionii de clor nu sînt nici adsor-

biţi pe coloizii din nerv [8] şi nici integraţi în biostructură* am constatat că concentraţia ionilor de clor trebuie calculată raportînd cantitatea lor numai la apa liberă a axoplasmei şi nu la apa totală a acesteia adică la suma cantităţilor de apă liberă, legată şi biostructurată**. În felul acesta concentraţia ionilor de clor din axonii giganţi de calmar capătă alte valori decît cele ale „concentraţiei"*** obţinute în lumina teoriei membranei, în cercetările lui Keynes [8], permiţînd şi o altă interpretare a variaţiei influxului ionilor de clor decît cea propusă de autorul menţionat, în cazul acţiunii DNP.

În cele ce urmează vom expune rezultatele acestei reinterpretări efectuate de pe poziţiile teoriei biostructurii. Menţionăm că pentru a analiza teoretic rezultatele lui Keynes [8] ne-am folosit de o serie de ecuaţii a căror rezolvare s-a realizat cu ajutorul unui program efectuat la calculatorul electronic ICL 1900.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Pentru calcularea concentraţiei ionilor de clor din axoplasma vie, în lumina teoriei biostructurii, am folosit următorul raţionament:

Dacă întreaga cantitate a ionilor de clor se află în apa liberă a axoplasmei şi potenţialul de repaos (E) al axonului gigant intact de calmar are valori cuprinse între 63 şi 72 mV (E mediu = 68 mV) [6], atunci ionii de clor aflaţi în apa liberă a axoplasmei vii trebuie să fie în echilibru cu cei din exterior, conform legii lui Nernst pentru potenţialul menţionat. Luînd însă în consideraţie nu concentraţiile ionilor de clor ci activităţile acestor ioni din apa liberă a axoplasmei şi din mediul exterior, rezultă că doar o parte din ionii de clor sînt influenţaţi de potenţialul de repaos al axonului, cealaltă parte fiind distribuită în mod egal între interiorul axonului şi în afara lui. În felul acesta, s-a conturat aplicarea unui sistem de două ecuaţii (1), (2), din care am calculat coeficientul de activitate (γ^i) şi concentraţia ionilor de clor din apa liberă a axoplasmei (Cl^i) (3), (4)

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{Cl^i \gamma^i}{Cl^0 \gamma^0}, \tag{1}$$

$$(1 - \gamma^i)\, Cl^i = (1 - \gamma^0)\, Cl^0, \tag{2}$$

$$Cl^i = Cl^0 \gamma^0 \left(e^{\frac{EF}{RT}} - 1 \right) + Cl^0, \tag{3}$$

$$\gamma^i = 1 - (1 - \gamma^0) \frac{Cl^0}{Cl^i}. \tag{4}$$

---

* Nu există pînă în prezent date care să demonstreze integrarea ionilor de clor în biostructură.

** Conform teoriei biostructurii apa protoplasmei vii se află sub trei forme diferite: o parte, fără însuşiri de solvent, este integrată în biostructură (apa biostructurată sau apa asimilată) şi se poate elibera odată cu destrămarea biostructurii provocată în cazul legării protoplasmei, altă parte, tot fără însuşiri de solvent, este legată de coloizi şi structuri (apa legată) şi numai a treia parte (apa liberă) formează soluţia intraplasmatică în care sînt dizolvate diferite substanţe.

*** Concentraţia calculată după teoria membranei o vom închide între ghilimele.

În aceste ecuații, în afara notațiilor deja menționate, Cl^0 este concentrația ionilor de clor în apa de mare artificială (560 mM/l), γ^0 coeficientul de activitate al ionilor de clor în apa de mare artificială ($\gamma^0 = 0{,}64$), R constanta gazelor perfecte ($R = 8{,}316$ joule/mol°K), F numărul lui Faraday ($F = 96520$ coulombi/mol), iar T temperatura absolută ($T = 293$°K).

S-a obținut astfel pentru concentrația ionilor de clor din apa liberă a axoplasmei (Cl^i) valoarea de 225 mM/kg H_2O, iar pentru coeficientul de activitate (γ^i) valoarea de 0,104. Datele obținute arată, pe de o parte, că concentrația ionilor de clor din axon, calculată după teoria biostructurii, este aproape dublă față de cea calculată după teoria membranei (123 mM/kg H_2O) și, pe de altă parte, că acești ioni au un coeficient de activitate scăzut. El nu este însă atît de scăzut încît să permită presupunerea integrării ionilor de clor în biostructură sau legării lor de către formațiunile coloidale din nerv.

Cunoscînd concentrația ionilor de clor din interiorul axonului, adică din apa liberă a axoplasmei, și admițînd că în axoplasmă, ca în orice celulă vie, pe lîngă apa liberă mai există și apă biostructurată, precum și apă legată de coloizi, am calculat în continuare, din datele experimentale comunicate de Keynes în tabela 1 a lucrării sale ([8], p. 694), proporția acestor două fracțiuni de apă.

Calculul s-a efectuat conform ecuației:

$$Cl^i = \frac{Cl^{exp}}{1 - x}, \tag{5}$$

în care Cl^{exp} este „concentrația" ionilor de clor obținută de Keynes, în urma determinărilor sale experimentale, iar x este proporția apei biostructurate și a apei legate de coloizii din axoplasmă.

Rezultatele obținute le-am prezentat în tabela 1.

După cum se observă, în axoplasma vie, apa biostructurată și apa legată de coloizi sînt, în medie, în proporție de $45{,}21 \pm 0{,}84\%$*.

Analizînd în continuare lucrarea menționată și folosind unele date obținute de Keynes în experiențele de determinare a coeficientului de activitate al ionilor din axoplasmă, am determinat concentrația ionilor de clor în apa liberă a axoplasmei (Cl^i) (cînd axoplasma era prelevată din axon) și proporția apei biostructurate și a celei legate de coloizi (x) (tabela 2).

Cl^i a fost determinat cu ajutorul ecuației (3) în care au fost luate următoarele valori: pentru E, cea determinată experimental de către Keynes (tabela 2, coloana 3); pentru γ^i, valoarea calculată de noi din sistemul de ecuații (3), (4): 0,104; pentru Cl^0, γ^0 (în cazul de față caracterizează soluția de referință): 100, 4 mM și respectiv 0,770, specifice pentru soluția 0,1 M KCl, iar pentru R, T, F cifrele deja menționate. În experiențele în care s-a folosit ca soluție de referință apa de mare artificială (ultimele patru din tabela 2), bazîndu-ne pe rezultatele experimentale ale lui Keynes privind potențialul cules între apa de mare artificială și soluția de KCl 0,1 M ($+ 32{,}6$ mV), am transformat valorile lui E obținute experi-

* Am exclus la calcularea mediei ultimele patru valori ale tabelei 1, întrucît acestea au fost obținute nu în condiții normale, ci în urma imersării axonului de experiență, perioade îndelungate de timp, în apa de mare artificială, fără cloruri.

Tabela 1

"Concentrația" ionilor de clor (Cl^{exp}) și proporția apei biostructurate și a apei legate de coloizi (x) din axonul gigant de calmar

(Coloanele 1 și 3 după Keynes ([8], p. 694), coloana 2 după teoria biostructurii)

1*	2	3
Cl^{exp} (mM/kg H_2O)	x (%)	Condiții
120	46,7	manta ținută la gheață; axon disecat
118	47,6	
112	50,2	
137	39,1	manta ținută la gheață; axoplasmă prelevată *in situ*
126	44	
138	38,7	calmar viu; axoni disecați
115	48,9	
123	45,3	manta ținută la gheață; axoplasmă prelevată *in situ*
120	46,7	
121	46,2	calmar viu; axoplasmă prelevată *in situ*
128	43,1	
129	42,7	
123	45,3	
120	46,7	
129	47,1	
	$\bar{x} + \sigma_{\bar{x}} = 45{,}21 \pm 0{,}84$**	
101	55,1	manta ținută la gheață; axon disecat și ținut 5 ore în apa de mare
107	52,4	aceeași manta; axon disecat și ținut 5 ore în apa de mare artificială, fără cloruri***
121	46,2	manta ținută la gheață; axon disecat și ținut 5,8 ore în apă de mare
94	58,2	aceeași manta; axon disecat și ținut 5,8 ore în apă de mare artificială, fără cloruri

* Valorile din această coloană nu au fost exprimate în mM/kg axoplasmă ca în tabela 1 din lucrarea analizată, ci considerîndu-se că axoplasma conține 880 g apă/kg axoplasmă, au fost exprimate în mM/kg H_2O.

** $\bar{x} + \sigma_{\bar{x}}$ reprezintă media valorilor, $\bar{x}$ reprezentînd estimata mediei ($\bar{x}$ mediu), iar $\sigma_{\bar{x}}$ estimata variației lui $\bar{x}$ (abaterea standard a mediei).

*** Apa de mare fără cloruri a fost preparată folosind azotați în locul clorurilor.

mental, în potențiale relative față de soluția 0,1 M KCl prin scăderea potențialului de 32,6 mV din valorile lui E.

Proporția apei biostructurate și a celei legate de coloizi a fost calculată cu ajutorul ecuației (5), în care valoarea pentru Cl^{exp} a fost luată din datele experimentale ale tabelei 2. După cum se observă din această tabelă, rezultatele obținute pentru concentrația ionilor de clor din apa liberă a axoplasmei sînt aproape duble față de valoarea obținută inițial, proporția apei biostructurate și a celei legate de coloizi crescînd în consecință foarte mult.

Tabela 2

"Concentrația" ionilor de clor din axon (Cl^{exp}), potențialul măsurat între soluția de referință și axoplasma (E), concentrația ionilor de clor din apa liberă a axoplasmei (Cl^{i}) calculată după ecuația (3) și proporția apei biostructurate și a apei legate de coloizi (x) din axonul gigant de calmar

(Coloanele 1, 2, 3 după Keynes ([8], p. 696), coloanele 4, 5 după teoria biostructurii).

1	2	3	4	5
Soluția de referință	Cl^{exp} (mM/kg H_2O)	E (mV)	Cl^{i} (mM/kg H_2O)	x (%)
0,1 M KCl	142	−10,2	495	71,4
	139	−11,2	476	70,8
	153	−12,2	451	66,1
Apă de mare artificială	133	− 2,6	451	70,5
	151	− 9,6	508	70,3
	132	−18,6	355	62,8
	162	− 7,6	550	70,5
	172	−13,6	433	60,3

Întrucît singura valoare din calculele de față pe care am împrumutat-o din datele obținute pentru cazul axonului viu este cea pentru coeficientul de activitate al ionilor de clor din apa liberă a axoplasmei vii (γ^{i}), înseamnă că deosebirea între cele două seturi de valori se datorează faptului că γ^{i} a variat în cele două cazuri. Mai precis, γ^{i} ar fi trebuit să crească pentru ca datele obținute de Keynes cu privire la coeficientul de activitate al ionilor de clor să dea, conform ecuației (3), concentrații apropiate de valoarea 225 mM/kg H_2O, obținută cu potențialul de repaos ce caracterizează axonul viu. Dar γ^{i} ar fi putut crește doar dacă în cazul experiențelor prezentate în tabela 2 concentrația ionilor de clor din apa liberă a axoplasmei s-ar fi micșorat.

Conform teoriei biostructurii, această scădere a concentrației ionilor de clor se poate explica prin fenomenul de destrămare parțială sau totală a biostructurii axoplasmei și de eliberare a apei și a substanțelor integrate în ea. Cum este foarte probabil că biostructura nervului nu conține ioni de clor, înseamnă că, în urma eliberării apei, concentrația ionilor de clor se va micșora și coeficientul de activitate al ionilor de clor din apa liberă a axoplasmei va crește.

Presupunerea unei destrămări masive a biostructurii ar fi justificată în cazul experiențelor de măsurare a coeficientului de activitate, întrucît în acestea s-a folosit axoplasma prelevată din axon, deci o axoplasmă în care integritatea biostructurii a fost cu siguranță lezată.

Verificarea acestei presupuneri s-a făcut o dată cu reinterpretarea datelor obținute de Keynes cu privire la acțiunea DNP asupra influxului clorului marcat, deoarece în ambele cazuri se părea că același fenomen de destrămare a biostructurii și de eliberare a apei și a substanțelor integrate în ea este responsabil de valorile experimentale rezultate. Într-adevăr atît reinterpretarea de pe pozițiile teoriei biostructurii [12], [13] a rezultatelor obținute de Hodgkin și Keynes [7] în problema distribuției ionilor de sodiu între axonii giganți de Sepia și mediul exterior, cît și cercetările experimentale efectuate pe frunzele vii de porumb [14] și pe nervii vii

de broască [15] au demonstrat existenţa fenomenului de destrămare a biostructurii şi de eliberare a apei şi a altor substanţe integrate în ea sub acţiunea DNP.

Keynes, tratînd axonii giganţi, pînă la trei ore, cu DNP şi apoi introducîndu-i timp de 20 min în soluţii ce conţineau ^{36}Cl, a arătat că influxul mediu al ^{36}Cl în axonii trataţi este cu mult mai mic ($9,2 \pm 1,3$ pM/cm^2. s) decît cel constatat în cazul axonilor martor ($21,9 \pm 2,2$ pM/cm^2.s). Nepresupunînd existenţa în celula vie a apei integrate în biostructură şi deci, neputînd nici admite eliberarea acestei ape sub acţiunea DNP, autorul lucrării analizate a ajuns la concluzia că datele respective nu se pot explica decît prin prezenţa unei „pompe de clor".

În reinterpretarea acestor date experimentale, verificarea existenţei fenomenului de destrămare a biostructurii şi de eliberare a apei asimilate şi, deci, implicit, excluderea mecanismului „pompei de clor", echivalau cu a controla dacă rezultatele astfel obţinute sînt compatibile cu un coeficient de activitate al ionilor de clor în apa liberă a axoplasmei (γ^i) mai mare decît cel găsit în cazul axonului intact, cu funcţionalitate nemodificată.

Pentru aceasta am considerat necesar să calculăm pentru 4 valori ale lui γ^i (0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8)* influxul ^{36}Cl în axon, în funcţie de concentraţia ionilor de clor din apa liberă a axoplasmei, cînd aceasta varia între 40 mM/kg H_2O şi 636 mM/kg H_2O, din patru în patru unităţi**. Testul consta în a observa dacă la o concentraţie apropiată de 225 mM/kg H_2O se obţine un influx calculat egal cu influxul experimental, pentru o valoare γ^i mai mare ca cea obţinută în cazul axonului intact.

Calculul influxului ionilor de clor marcat (M) l-am efectuat cu ajutorul formei integrate a ecuaţiei lui Goldman (4) :

$$M = \frac{u}{a} (Cl^i\gamma^i + Cl^0\gamma^0) \frac{RT}{F} \ln \frac{Cl^i\gamma^i}{Cl^0\gamma^0} \qquad (6)$$

În această ecuaţie, în afară de notaţiile deja menţionate, u este mobilitatea ionilor de clor (cm^2/mV. s) iar a grosimea membranei (cm).

Întrucît datele lui Keynes nu indicau nici valoarea lui u, nici pe a lui a, am estimat raportul lor cu ajutorul aceleiaşi ecuaţii, folosind ca valoare a influxului cifra obţinută de Keynes în cazul axonului de control : $21,9 \pm 2,2$ pM/cm^2. s. Pentru raportul u/a s-a obţinut : $-0,84 \pm 0,084$ $\frac{cm}{mV.s}$.

Rezultatele calculului parametric efectuat sînt prezentate, pentru diferite valori ale lui γ^i, în figura 1.

După cum se observă din reprezentarea grafică a influxului ionilor de clor marcat în funcţie de concentraţie (fig. 1), pentru $\gamma^i = 0,2$ nu se obţine nici o valoare a influxului egală cu $9,2 \pm 1,3$ pM/cm^2. s (valoarea

* Am ales pentru γ^i aceste valori întrucît sub valoarea de 0,2 se cădea peste cifra găsită pentru axonul intact, iar peste 0,8 γ^i nu mai avea sens pentru că activitatea ionilor de clor se apropia foarte mult de concentraţia lor.

** Am ales ca limite ale concentraţiilor valorile menţionate, întrucît sub şi peste aceste valori cifrele nu mai reprezentau o valoare reală pentru concentraţia ionilor de clor din apa liberă a axoplasmei.

experimentală pentru nervul tratat), iar pentru γ^i : 0,4 ; 0,8, concentrațiile corespunzătoare limitelor influxului menționat (7,9 — 10,5 pM/cm ^{2}. s) nu încadrează valoarea găsită de noi pentru axonul intact. În schimb, pentru $\gamma^i = 0{,}6$, la un influx între 7,9 și 10,5 pM/cm ^{2}. s, corespund valori ale concentrației ionilor de clor în apa liberă a axoplasmei între 216 și 300

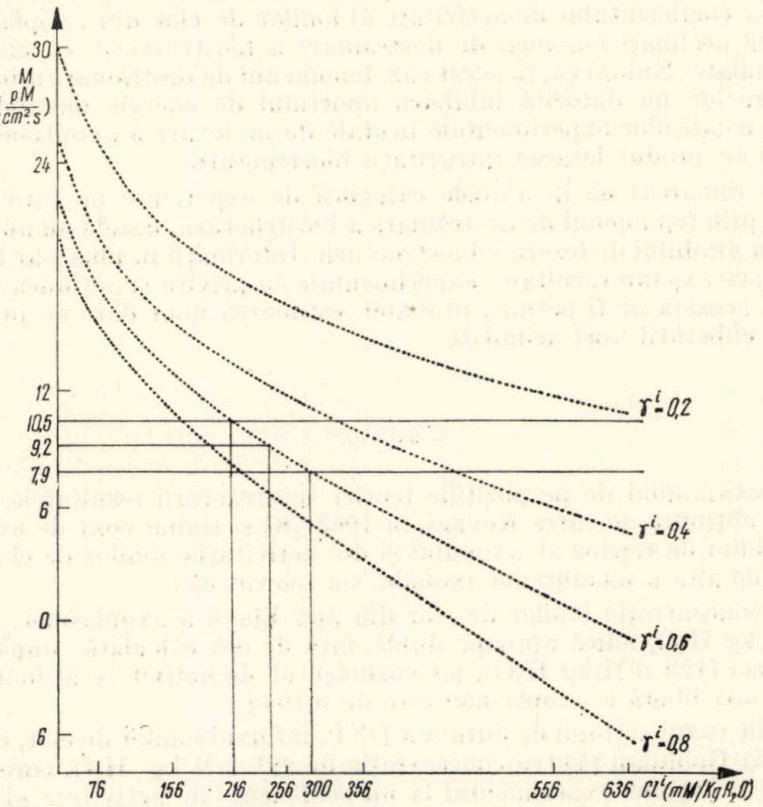


Fig. 1. — Influxul ionilor de clor marcat (M) în funcție de concentrația ionilor de clor din apa liberă a axoplasmei (Cl^i), cînd această concentrație variază din 4 în 4 unități de la 40 mM/kg H_2O la 636 mM/kg H_2O.

mM/kg H_2O, limite care cuprind cifra de 225 mM/kg H_2O ce caracterizează concentrația ionilor de clor în apa liberă a axonului viu.

Rezultatul obținut arată deci că în cazul acțiunii DNP datele experimentale sînt compatibile cu un coeficient de activitate al ionilor de clor în apa liberă a axoplasmei de 0,6, aproximativ egal cu cel din apa de mare artificială (0,64) și mult mai mare decît coeficientul obținut în cazul axonului intact (0,104).

În consecință, influxul ionilor de clor obținut în cazul acțiunii DNP este mai scăzut decît cel estimat pentru axonul netratat, nu pentru că ar fi vorba de un fenomen de transport activ al clorului, ci pentru că sub influența inhibitorului DNP aportul de energie metabolică pe seama căruia biostructura își menține integritatea se micșorează, iar în consecință

biostructura începe să se destrame. După cum se observă din calculele efectuate cu ecuația lui Goldman, influxul ^{36}Cl pentru axonul tratat se supune unui transport pasiv.

În plus, obținerea acestui coeficient de activitate ridicat arată că și neconcordanța dintre valorile pentru Cl^i și x, calculate pentru axonul intact, și cele obținute din datele experimentale ale lui Keynes, referitoare la aflarea coeficientului de activitate al ionilor de clor din axoplasmă, se datorează aceluiași fenomen de destrămare a biostructurii, cu eliberarea apei asimilate. Numai că, în acest caz, fenomenul de destrămare a biostructurii are loc nu datorită inhibării aportului de energie metabolică, ci datorită condițiilor experimentale brutale de prelevare a axoplasmei, care probabil au produs lezarea integrității biostructurii.

De remarcat că în ambele categorii de experiențe pe care le-am explicat prin fenomenul de destrămare a biostructurii, datele nu au permis decelarea gradului de lezare a biostructurii. Informații în plus s-ar fi putut obține dacă existau rezultate experimentale cu privire la acțiunea în timp a DNP; aceasta ar fi permis, probabil, estimarea unor date cu privire la cinetica eliberării apei asimilate.

CONCLUZII

Reexaminînd de pe pozițiile teoriei biostructurii rezultatele experimentale obținute de către Keynes în 1963 [8] și ținînd cont de existența potențialului de repaos al axonului și de activitățile ionilor de clor, de o parte și de alta a membranei axonale, s-a relevat că:

1) concentrația ionilor de clor din apa liberă a axoplasmei este de 225 mM/kg H_2O, adică aproape dublă față de cea calculată după teoria membranei (123 mM/kg H_2O), iar coeficientul de activitate al ionilor de clor din apa liberă a axoplasmei este de 0,104;

2) în cazul acțiunii de durată a DNP, influxul ionilor de clor, calculat cu ecuația Goldman pentru concentrația de 225 mM/kg H_2O, corespunde cu influxul obținut experimental la un coeficient de activitate al ionilor de clor din apa liberă a axoplasmei, crescut (0,6) față de cel inițial, dovedind o scădere a concentrației ionilor de clor din această apă, ca urmare a eliberării apei asimilate din biostructură; scăderea influxului ionilor de clor marcat observată experimental nu trebuie deci explicată prin fenomenul inhibării „pompei de clor" de către DNP, ci se poate explica printr-un fenomen de transport pasiv.

Prezentată la redacție la 6 aprilie 1971

Laboratorul de biofizică,
Facultatea de biologie,
Universitatea București

BIBLIOGRAFIE

1. Adrian, R. H., J. Physiol., **151**, 1540 (1960).
2. Adrian, R. H., J. Physiol., **156**, 623 (1961).
3. Donlon, J. A., Rothstein, A. J., J. Membrane Biol., **1**, 37 (1969).

4. Goldman, D. E., J. gen. Physiol. , **27**, 37 (1943).
5. Hodgkin, A. L., Biol., Rev., **26**., 339 (1951).
6. Hodgkin, A. L., Proc., Roy. Soc. , **148 B**, 1 (1958).
7. Hodgkin, A. L., Keynes, R. D., J. Physiol., **128**, 28 (1955).
8. Keynes, R. D., J. Physiol., **169**, 690 (1963).
9. Macovschi, E., Rev. roum. Biochim., **2**, 189 (1965).
10. Macovschi, E., Rev. roum., Biochim., *2*, 285 (1965).
11. Macovschi, E., *Biostructura*, Edit. Academiei, Buc. (1969).
12. Macovschi, E., St. cerc. biochim., **12**, 5 (1969).
13. Macovschi, E., St. cerc. biochim., **12**, 105 (1969).
14. Macovschi, E., Frunzeti, V., St. cerc. biochim., **12**, 19 (1969).
15. Mosora, F., St. cerc. biochim., **14**, 63 (1971).
16. Steinbach, H. B., J. Cell. Comp. Physiol., **17**, 57 (1941).

TRANSPORT OF CHLORIDE IONS BETWEEN THE SQUID GIANT AXON AND THE EXTERNAL MEDIUM, UNDER THE ACTION OF DNP

SUMMARY

The theoretical analysis of the experimental results obtained by Keynes [8] concerning the transport of chloride ions between the giant axon of the squid and the surrounding medium after a prolonged DNP action, showed that the decrease in the chloride ions influx observed experimentally is not the consequence of the inhibition of the "chloride pump" but can be explained by a passive transport which obeys Goldman's equation. This analysis has taken into account the existence of the resting potential of the axon, the presence within axoplasm of three water fractions, namely free water (containing the whole amount of chloride ions), bound water and biostructured water (which could be released when biostructure breaks up) as well as the activity of chloride ions in the free water of axoplasm an in the external medium.

ST. CERC. BIOCHIM., 14,4, 419–424 (1971)

CERCETĂRI CHEMOTAXONOMICE LA PLANTELE SUPERIOARE V. PIGMENȚII CAROTINOIDICI DIN *FORSYTHIA SUSPÉNSA*

GAVRIL NEAMȚU și CORNEL BODEA

Rezumat. — S-au cercetat pigmenții carotinoidici din frunze și flori de *Forsythia suspénsa*, obținute prin înflorire și înfrunzire forțată și naturală. Florile și frunzele obținute în condiții naturale, la lumină solară, directă, conțin pigmenți carotinoidici în cantitate mai mare decît florile și frunzele obținute prin înflorire și înfrunzire forțată. Între pigmenții carotinoidici din florile de *Forsythia suspénsa* și cei din *F. intermedia*, *F. europaéa* și *F. viridissima* nu există deosebiri calitative ci numai cantitative, ce nu au o semnificație deosebită.

Dintre puținele specii de plante superioare care înfloresc primăvara de timpuriu, înaintea formării frunzelor, fac parte și plantele din genul *Forsythia* [1]. Întrucît speciile din acest gen formează, la începutul primăverii, numeroase flori de culoare galben-aurie, ele sînt folosite în numeroase țări ca arbuști decorativi, în special în parcuri și grădini publice [1], [2].

Plantele din genul *Forsythia* se caracterizează atît prin apariția florilor înaintea formării frunzelor cît și prin ușurința cu care pot fi determinate să înflorească forțat (în sere sau laboratoare), chiar la sfîrșitul iernii. Această comportare fiziologică diferită de a majorității plantelor superioare, sub aspectul înfloritului, ne-a determinat să cercetăm pigmenții carotinoidici foliari și florali din *Forsythia suspénsa*, specie larg răspîndită în țara noastră [1] și care pînă în prezent n-a fost cercetată sub aspectul pigmenților carotinoidici. Dintre speciile de *Forsythia* este menționată sub acest aspect numai *F. intermedia* [3], fără să se prezinte cromatograma carotinoidelor florale sau foliare.

Cunoașterea pigmenților carotinoidici la plante din genul *Forsythia* este importantă și din punct de vedere teoretic, deoarece carotinoidele din flori apar înaintea formării frunzelor și, deci, și a producerii fotosintezei, prin care se formează substanțe organice ce pot contribui la biosinteza carotinoidelor.

În prezenta lucrare s-au determinat pigmenții carotinoidici din frunze și din flori de *Forsythia suspénsa*, obținute prin înflorire naturală și forțată, la temperatura camerei, la lumină solară indirectă și la întuneric. S-au determinat de asemenea carotinoidele florale din *Forsythia intermedia*, *F. europaéa* și *F. viridissima*.

MATERIAL ȘI METODĂ

Pentru determinarea pigmenților carotinoidici s-a folosit material proaspăt (frunze și flori), recoltat între anii 1967 — 1971, de pe arbuști de *Forsythia* de la Institutul agronomic, Grădina Botanică și din parcul orașului Cluj.

La începutul cercetării s-au determinat pigmenții carotinoidici din flori și frunze de *F. suspénsa* obținute prin înflorire și înfrunzire forțată, în laborator, la temperatura camerei (20 — 22°C) și la lumină indirectă. Înflorirea forțată s-a putut obține numai la sfîrșitul lunii februarie (după 24—25 februarie), în anii 1968, 1970, 1971, cînd temperatura medie în luna februarie a fost la Cluj de +1°C, precum și la începutul lunii martie (după 6 — 7 martie) în 1967, 1969, cînd temperatura medie în luna februarie a fost la Cluj de — 1,4°C. Încercările de a determina înflorirea plantei la lunile decembrie, ianuarie și la începutul lunii februarie nu au dat rezultate. Din muguri se formează frunze, dar nu și flori.

Pentru determinarea înfrunzirii și înfloririi forțate s-a procedat astfel : s-au tăiat ramuri cît mai tinere de pe arbuști de *Forsythia suspénsa* și s-au pus imediat într-un flacon Erlenmeyer de 2 litri, cu apă distilată. Flaconul s-a pus în laborator, la temperatura relativ constantă de 20—22°C și la lumină solară indirectă. Gura flaconului a fost acoperită cu tifon steril și cu vată. Apa se schimbă tot din două în două zile. Pentru a urmări influența luminii asupra înfloritului, s-au pus probe paralele și la întuneric complet. Experiențele au fost repetate în toți anii menționați. Plantele puse să înflorească forțat în laborator au înflorit după 46—48 ore atît la lumină cît și la întuneric. În timpul înfloririi, din unii muguri de la partea superioară a ramurii apar și frunze.

Materialul obținut prin înflorire și înfrunzire naturală s-a recoltat la sfîrșitul lunii martie și în luna aprilie, de pe aceiași arbuști de pe care s-au tăiat ramuri pentru producerea înfloririi forțate.

Extragerea pigmenților carotinoidici s-a făcut cu amestec de eter de petrol-acetonă-metanol 6 :3 :1. Florile obținute prin înflorire forțată la întuneric au fost tratate cu apă fierbinte, imediat după recoltare, tot la întuneric, pentru a opri interconversiunea enzimatică a carotinoidelor, sub influența luminii.

Separarea carotinoidelor s-a efectuat prin cromatografie pe coloană (38 × 3 cm), utilizînd ca adsorbant un amestec de oxid de magneziu și nisip fin, în raportul de 1 : 2 în greutate. Developarea cromatogramelor s-a făcut cu amestec de eter de petrol-benzen-acetonă, a cărui polaritate a crescut treptat ajungîndu-se în final la proporția de 75 : 20 : 5. Pentru verificarea purității pigmenților și pentru cromatograme de amestec cu carotinoidele extrase din alte plante s-a folosit cromatografia în strat subțire, utilizîndu-se ca adsorbant oxid de magneziu (Union Chimique Belge S.A.), iar ca developant amestec de metanol-cloroform-eter de petrol 2 :2 :6.

Saponificarea xantofilelor esterificate s-a făcut cu soluție etanolică de hidroxid de potasiu 10 %, timp de o oră, la 40°C.

Carotinoidele epoxidice s-au pus în evidență prin reacția de culoare pe care o dau cu acid clorhidric concentrat în eter etilic [4].

Identificarea şi determinarea pigmenţilor carotinoidici s-a făcut prin metode cromatografice, spectroscopice şi colorimetrice, ca şi în lucrările anterioare [5], [6].

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Determinările cantitative ale pigmenţilor carotinoidici din frunzele obţinute prin înfrunzire forţată, înainte de înflorire (luna ianuarie), în timpul înfloririi (luna martie) şi după înflorire (forţată şi naturală, luna martie şi aprilie) sînt prezentate în tabela 1.

Tabela 1

Conţinutul de carotinoide din frunzele de *Forsythia suspensa*, obţinute înainte de înflorire, în timpul înfloririi şi după înflorire (forţată şi naturală), în mg/100 g frunze proaspete

Carotinoide	Perioada de recoltare a frunzelor			
	înainte de înflorirea forţată	în timpul înfloririi forţate	după înflorirea forţată	după înflorirea naturală
a) *Carotinoide hidrocarburice*				
β-carotina	1,12	0,86	0,63	1,00
b) *Xantofile*				
Criptoxantina	—	urme	0,10	0,24
Luteina	1,70	1,33	1,02	1,42
c) *Carotinoide epoxidice*				
Eloxantina	—	0,14	0,08	0,24
Violaxantina	0,16	0,23	0,12	0,32
Neoxantina	—	—	0,09	0,18
Total carotinoide	2,98	2,56	2,04	3,42

Din rezultatele obţinute reiese că între pigmenţii carotinoidici extraşi din frunze formate înainte de înflorire, în timpul înfloririi şi după înflorire (forţată şi naturală) există diferenţieri atît calitative cît şi cantitative. În frunzele formate înainte de înflorire, alături de carotinoidele de bază, β-carotină şi luteina, care se găsesc în cantitate mai mare decît în celelalte categorii de frunze, s-a identificat numai violaxantina, în cantitate mică.

Prin faptul că pigmenţii carotinoidici foliari se diversifică în timpul înfloririi şi se îmbuţinează cantitativ, se poate presupune că ei servesc fie direct, fie prin interconversiune, la formarea carotinoidelor florale. Întrucît β-carotina şi luteina sînt în cantitate mai mare în toate tipurile de frunze, este posibil ca aceste carotinoide să contribuie, prin reacţii de oxidoreducere şi de interconversiune, la formarea celorlalte carotinoide care se găsesc în frunze şi în flori. β-Carotina poate să formeze cu uşurinţă carotinoide cu structură β (criptoxantina, anteraxantina, violaxantina, neoxantina), iar luteina poate să formeze prin oxidare eloxantina, care prin izomerizare se transformă în flavoxantină. În prezent este bine cunoscută

interconversiunea enzimatică și neenzimatică a carotinoidelor foliare, la diferite specii de plante [7] — [11]. În reacțiile de interconversiune, carotinoidele epoxidice, care apar în cantitate mai mare în timpul înfloririi și după înflorire, au probabil un rol principal.

În frunzele obținute prin înfrunzire naturală se găsesc aceleași carotinoide ca și în frunzele obținute după înflorire forțată, dar în cantitate ceva mai mare.

Pigmenții carotinoidici din flori, obținuți prin înflorire forțată, la lumină solară indirectă și la întuneric, precum și prin înflorire naturală, sînt trecuți în tabela 2.

Tabela 2

Conținutul de carotinoide din florile de *Forsythia suspensa* obținute prin înflorire forțată și înflorire naturală (mg/100 g flori proaspete)

Carotinoide	Înflorire forțată la		Înflorire naturală
	lumină indirectă	întuneric	
a) *Carotinoide hidrocarburice*			
β-Carotina	0,86	0,28	0,94
b) *Xantofile*			
Criptoxantină ester	0,20	urme	0,34
Luteină ester	1,80	1,30	2,41
Zeaxantină ester	0,16	—	0,28
c) *Carotinoide epoxidice*			
Falvoxantina			0,26
Eloxantina	urme	0,42	0,63
Anteraxantina	0,58	0,34	0,08
Violaxantina	—	—	0,47
	0,36	0,18	
Total carotinoide	3,96	2,52	5,41

Ca un aspect caracteristic apare predominarea în flori a carotinoidelor care se găsesc și în frunze, cu excepția neoxantinei, care nu se găsește în flori. Dintre carotinoidele hidrocarburice s-a identificat și în flori numai β-carotina, iar dintre xantofile criptoxantina ester și luteina ester, care în frunze apar în stare liberă, precum și zeaxantina ester, ce apare numai în flori. Carotinoidele epoxidice din flori sînt mai numeroase și mai variate. Alături de eloxantină și violaxantină se află flavoxantina și anteraxantina.

Florile obținute prin înflorire forțată, atît la lumină solară indirectă cît și la întuneric, conțin carotinoide în cantitate mai mică decît florile obținute prin înflorire naturală, la lumină solară directă. Din această constatare se poate trage concluzia că lumina solară directă favorizează formarea carotinoidelor, dar nu determină procesul de biosinteză a acestora, deoarece carotinoidele apar și în florile obținute la întuneric complet. Dintre factorii de mediu care determină înflorirea forțată și, deci, și formarea carotinoidelor florale, temperaturii îi revine rolul principal, și nu luminii. Ramurile de pe aceiași arbuști care nu au fost puse în laborator, la o temperatură relativ ridicată față de cea din mediul înconjurător, nu au înflorit în aceeași perioadă în care s-a produs înflorirea forțată.

În florile obţinute la întuneric, β-carotina, luteina şi violaxantina se află în cantitate cu mult mai mică decît în florile obţinute la lumină, în timp ce flavoxantina este singurul pigment care se află în cantitate mai mare la întuneric decît la lumină.

Raportul dintre carotinoidele oxigenate (xantofile şi carotinoide epoxidice) şi cele hidrocarburice este cuprins între 5,0 şi 5,7 la florile obţinute la lumină solară indirectă şi directă, fiind asemănător cu cel din florile plantelor ce cresc în regiuni montane şi subalpine [12]. La florile obţinute la întuneric, raportul menţionat este de 11,5, indicînd o predominare covîrşitoare a carotinoidelor oxigenate.

Sub aspect cantitativ predomină carotinoidele cu structură α (luteina ester, eloxantina, flavoxantina), care imprimă florilor culoarea galbenă. Carotinoidele cu structură β (β-carotina, criptoxantina, zeaxantina, violaxantina, anteraxantina) dau florilor nuanţa galbenă-aurie.

Din genul *Forsythia* s-au determinat pigmenţii carotinoidici şi din florile de *F. intermedia* Zabel., *F. europaéa* Zeg şi Baldocci şi *F. viridissima* Lindl., care de asemenea au flori de culoare galbenă şi se cultivă ca arbuşti ornamentali. La aceste specii carotinoidele au fost determinate numai din flori obţinute prin înflorire naturală, la lumină solară directă.

Tabela 3

Conţinutul de carotinoide din florile de *Forsythia intermedia*, şi *F. europaèa* şi *F. viridissima* obţinute prin înflorirea naturală (mg/100 g flori proaspete)

Carotinoide	*Forsythia intermedia*	*Forsythia europaéa*	*Forsythia viridissima*
a) *Carotinoide hidrocarburice*			
β-Carotina	0,82	0,76	0,93
b) *Xantofile*			
Criptoxantină ester	0,30	0,24	0,36
Luteină ester	2,50	2,16	2,28
Zeaxantină ester	0,21	0,15	0,26
c) *Carotinoide epoxidice*			
Flavoxantina	0,30	0,23	0,18
Eloxantina	0,45	0,36	0,32
Anteraxantina	0,12	0,09	0,05
Violaxantina	0,37	0,28	0,43
Total carotinoide	5,07	4,28	4,81

Între pigmenţii carotinoidici din florile de *F. suspénsa* Vahl., obţinute tot prin înflorire naturală, şi cei din florile celorlalte specii de *Forsythia* menţionate nu există deosebiri calitative, ci numai cantitative, ce nu au o semnificaţie deosebită.

Prin faptul că raportul dintre carotinoidele oxigenate şi cele hidrocarburice este foarte mare, la toate speciile de *Forsythia*, apreciem că acest raport poate constitui un criteriu chemotaxonomic pentru întregul gen.

CONCLUZII

Florile și frunzele de *Forsythia suspénsa*, obținute prin înflorire și înfrunzire forțată, conțin pigmenți carotinoidici în cantitate mai mică decît florile și frunzele obținute în condiții naturale, sub acțiunea luminii solare directe.

Dintre factorii de mediu care determină înflorirea și înfrunzirea forțată, temperatura relativ ridicată față de cea a mediului înconjurător, are rolul principal.

Dintre carotinoidele hidrocarburice, în diferitele specii de *Forsythia* s-a identificat numai β-carotina, astfel că raportul dintre carotinoidele oxigenate și cele hidrocarburice este foarte mare și poate constitui un criteriu chemotaxonomic.

Prezentat la redacție la 7 aprilie 1971.

Catedra de biochimie,
Institutul agronomic „Dr. P. Groza", Cluj

BIBLIOGRAFIE

1. T. SĂVULESCU, *Flora Republicii Populare Române*, vol. 8, Edit. Academiei, 1961, p. 521.
2. C. BONSTEDT, *Pareys Blumengärtnerei*, Verlag von Paul Parey, Berlin, 1932, p. 191.
3. R. KUHN, I. LÖW, B., **82**, 474 (1949) citat din *Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe* (de *W. Karrer*). Birkhäuser Verlag, Basel-Stuttgart, 1958, p. 733.
4. T. W. GOODWIN, *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Academic Press, Londra-New York, 1965, p. 528.
5. G. NEAMȚU, GH. ILLYES, C. BODEA, St. cerc. biochim., **12**, 77 (1969).
6. G. NEAMȚU, C. BODEA, St. cerc. biochim., **13**, 59 (1970).
7. H. Y. YAMAMOTO, T. O. M. NAKAYAMA, C. O. CHICHESTER, Arch. Biochem. Biophys., **97**, 168 (1962).
8. C. COSTES, M. E. DEROCHE, Compt. rend., **961**, 4893 (1965).
9. C. COSTES, Ann. Physiol. Vég. **10**, 171 (1968).
10. H. I. VIRGIN, Physiol. Plantarum, **20**, 314 (1967).
11. L. R. G. VALADON, R. S. MUMMERY, J. Expt. Bot., **20**, 732 (1969).
12. G. NEAMȚU, C. BODEA, St. cerc. biochim., **13**, 307 (1970).

CHEMOTAXONOMIC RESEARCHES ON HIGHER PLANTS. V. CAROTINOID PIGMENTS OF *FORSYTHIA SUSPÉNSA* VAHL

SUMMARY

The carotinoid pigment content of *Forsythia suspénsa* leaves and flowers obtained from plants grown under natural or forced conditions forms the object of the present study.

The blossoms obtained under natural conditions, that is maintained at solar light, contain higher amounts of carotinoid pigment than leaves and flowers of plants obtained under forced culture.

No qualitative differences were found among carotinoid pigments of *Forsythia suspénsa*, *F. intermedia*, *F. europaéa* and *F. viridissima*, quantitative differences were noted but they are of no special significance if any.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 4, 425–431 (1971)

ELIBERAREA IONILOR DE POTASIU, CALCIU, SODIU, PRECUM ŞI A FOSFORULUI ANORGANIC DIN BIOSTRUCTURA ŢESUTULUI FOLIAR DE PORUMB, SUB ACŢIUNEA INHIBITORILOR METABOLICI

MARIA RABEGA

Rezumat. — Cercetările efectuate pe sucurile frunzelor de porumb au demonstrat că acţiunea inhibitorilor metabolici asupra biostructurii foliare nu depinde de metoda de introducere a acestora în ţesutul foliar. Astfel, utilizînd fie vacuum-infiltraţia, fie metoda capilară, s-au obţinut rezultate asemănătoare cu privire la conţinutul şi cantitatea ionilor de potasiu, calciu, sodiu, precum şi fosfor anorganic din sucurile vacuolare şi plasmatice de porumb cu cele obţinute prin metoda absorbţiei. În felul acesta s-a dovedit că vacuum-infiltraţia nu lezează ţesutul foliar cu toate că în timpul prelucrării frunzele sînt puse în condiţii anormale de existenţă, deoarece spaţiile aerifere intercelulare ale frunzelor sînt pline cu soluţii.

Într-o lucrare publicată anterior [1] s-a arătat că inhibitorii metabolici, introduşi în frunzele de porumb prin metoda absorbţiei, destramă parţial biostructura, eliberînd, pe lîngă o parte din apa asimilată, unele substanţe hidrosolubile şi ioni de potasiu, calciu, sodiu, precum şi fosfor anorganic.

Inhibitorii metabolici introduşi în ţesutul foliar viu prin metoda absorbţiei se răspîndesc în plantă în condiţii normale, în timp ce prin vacuum-infiltraţie [2] planta este pusă în condiţii anormale, deoarece spaţiile aerifere intercelulare ale frunzei sînt ocupate de soluţii. În acest din urmă caz nu ar fi exclus să se producă unele modificări care să se reflecte în rezultatele obţinute. De aceea am considerat necesară compararea datelor găsite folosind ca metodă de introducere a inhibitorilor metabolici vacuum-infiltraţia, cu rezultatele obţinute folosind în acelaşi scop metoda absorbţiei.

Pentru aceasta am utilizat ca metodă de introducere a inhibitorilor metabolici în ţesutul foliar viu atît metoda vacuum-infiltraţiei, cît şi metoda capilară [3]. Aceasta din urmă se aseamănă mult cu metoda absorbţiei, deoarece inhibitorii metabolici utilizaţi se răspîndesc în ţesutul foliar viu în condiţii normale, fiind vorba de un proces lent de absorbţie a soluţiei de către plantă.

Dacă procesul de destrămare a biostructurii ţesutului foliar viu sub influenţa inhibitorilor metabolici depinde de metoda de introducere a acestora în ţesut, ar fi de aşteptat ca rezultatele obţinute prin metodele amintite să difere unele de altele. În lucrarea de faţă ne-am propus să lămurim cum stau lucrurile în această privinţă.

În consecință am efectuat o serie de cercetări privind eliberarea ionilor de potasiu, calciu, sodiu, precum și a fosforului anorganic din biostructura care se destramă parțial sub acțiunea 2,4-dinitrofenolului și a azidei de sodiu, care au fost introduși în țesutul foliar viu atît prin metoda vacuum-infiltrației, cît și prin metoda capilară.

Un alt grup de cercetări cu privire la eliberarea acelorași ioni, precum și a fosforului anorganic din țesutul foliar viu le-am făcut utilizînd soluții de zaharoză și alanină, care nu prezintă însușiri de inhibitori.

MATERIAL ȘI METODĂ

Cercetările experimentale le-am efectuat pe frunze de plantule de porumb HS 301 și HS 409, după 14 — 16 zile de creștere în condiții de seră. Ca inhibitori metabolici am folosit soluții apoase de 2,4-dinitrofenol de concentrație 10^{-3} M și azidă de sodiu de concentrație 10^{-2}M, iar ca substanțe care nu prezintă proprietăți de inhibitori am utilizat soluții de zaharoză și alanină de concentrațiile 10^{-2}, 2.10^{-2} și 4.10^{-2}M.

Pentru introducerea acestor soluții, precum și a apei (proba martor) în țesutul foliar viu, am utilizat atît metoda vacuum-infiltrației [2], cît și metoda capilară [3]. În toate determinările am folosit o cantitate de 50 g frunze. Pentru stoarcerea frunzelor supuse tratamentului menționat mai sus, am utilizat o presă hidraulică de laborator tip Hafico, model 2 litri. Presiunea se ridica treptat la 150 at și se menținea pînă la încetarea scurgerii sucului, în medie 15 min.

Reziduurile obținute după stoarcerea frunzelor proaspete erau ținute într-o atmosferă de vapori de cloroform pentru omorîrea țesutului. După aceea erau stoarse la presă în aceleași condiții ca și frunzele proaspete.

Cantitățile de suc obținute se măsurau cu cilindrul gradat și se centrifugau la 3000 rot /min, timp de 15 min.

În aceste sucuri am determinat concentrația și conținutul ionilor de potasiu, calciu și sodiu la fotometrul cu flacără model Carl Zeiss Jena.

Fosforul anorganic din aceleași sucuri l-am dozat prin metoda Goldengerg-Fernandez [4], iar citirile s-au făcut la spectrocolorimetrul Spekol model Carl Zeiss Jena.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Comparînd rezultatele obținute folosind ca metodă de introducere a inhibitorilor metabolici în țesutul foliar viu vacuum-infiltrația, cu rezultatele obținute folosind în același scop metoda capilară (tabelele 1 și 2) se constată că în primul caz valorile sînt mai mari fie că se ia în considerație cantitatea de suc, fie concentrația sau conținutul componentelor luate în studiu. S-ar părea deci că prin vacuum-infiltrație inhibitorii metabolici sînt introduși mai adînc în biostructură, ceea ce determină o destrămare mai accentuată a acesteia. În aceste condiții se eliberează o cantitate mai

Tabela 1

Cantitatea de suc (ml), concentrația și conținutul ionilor de potasiu, calciu, sodiu, precum și fosfor anorganic din sucurile obținute prin stoarcerea la 150 at a probelor de cîte 50 g frunze proaspete de porumb, tratate cu soluții de 2,4 - dinitrofenol (DNP) și cu azidă de sodiu (NaN_3) de concentrație 10^{-3} M, respectiv 10^{-2} M, față de proba martor tratată cu apă (frunze martor).

Componentul determinat	Metoda de vacuum-infiltrație			Metoda capilară		
	Frunze martor	DNP	NaN_3	Frunze martor	DNP	NaN_3
Suc ml	15	26	32	13	18	22
	14	25	33	12	19	23
	16	24	30	10	19	22
	Concentrația componentelor în suc (mg/100 ml)					
K	136	196	206	71	128	188
	126	186	202	96	142	150
	108	172	224	102	168	200
Ca	34	54	64	20	30	40
	26	48	56	31	52	62
	40	60	72	24	74	54
Na	6,2	9,8	13,2	4,2	7,6	14
	5,9	9,0	12,8	5,1	8,5	11,3
	6,6	9,4	13,8	6,4	8,0	12
P	47	128	148	36	130	140
	62	130	154	42	156	115
	42	114	144	60	108	150
	Cantitatea totală de componente din sucul stors (mg)					
K	20,4	50,9	65,9	9,2	23,0	41,4
	17,6	48,5	66,7	11,5	27,0	34,5
	17,3	41,3	67,2	10,2	31,9	44,0
Ca	5,1	14,0	20,5	2,6	5,4	8,8
	3,6	12,0	18,5	3,7	9,9	14,3
	6,4	14,4	21,6	5,4	14,1	11,9
Na	0,93	2,55	4,22	0,55	1,37	3,08
	0,83	2,22	4,22	0,61	1,62	2,60
	1,06	2,26	4,14	0,64	1,52	2,64
P	7,05	33,3	47,4	4,68	23,4	30,8
	8,68	32,5	50,8	5,04	29,6	26,5
	6,72	27,4	43,2	6,00	20,5	33,0

Rezultatele reprezintă media a trei experiențe complete.

mare de apă și din componentele luate în studiu, care prin stoarcere se elimină o dată cu sucul vacuolar.

Cercetînd în continuare datele prezentate în tabela 1 se constată că inhibitorii metabolici introduși în țesutul foliar viu fie prin vacuum-infiltrație, fie prin metoda capilară, acționează asemănător asupra biostructurii, adică o destramă în parte, eliberînd o cantitate din apa și din

Tabela 2

Cantitatea de suc(ml), concentrația și conținutul ionilor de potasiu, calciu, sodiu, precum și fosfor anorganic din sucurile obținute de la reziduurile rămase după stoarcerea celor 50 g frunze proaspete de porumb tratate cu apă (proba martor) și cu soluții de 2,4-dinitrofenol (DNP) și azidă de sodiu (NaN_3), reziduuri care au fost omorîte cu vapori de cloroform.

Componentul determinat	Metoda de vacuum-infiltrație			Metoda capilară		
	Frunze martor	DNP	NaN_3	Frunze martor	DNP	NaN_3
Suc, ml	21	14	12	19	11	10
	23	15	11	17	11	9
	24	13	10	17	10	7
	Concentrația componentelor în suc (mg/100 ml)					
K	260	292	250	180	228	220
	250	348	218	260	320	218
	320	306	228	225	400	235
Ca	80	52	50	84	40	47
	84	62	46	70	52	46
	74	54	56	63	75	64
Na	13,6	11,2	8,6	12,4	11,8	13,1
	12,8	10,6	8,6	11,3	12,6	12,8
	12,4	10,2	9,5	9,5	9,1	9,2
P	400	310	255	410	300	240
	370	330	240	370	330	210
	355	340	235	326	360	180
	Cantitatea totală de componente din sucul stors (mg)					
K	54,6	40,9	30,0	34,2	24,1	22,0
	57,5	52,2	24,0	44,2	35,2	19,6
	76,8	39,8	22,8	38,3	40,0	16,5
Ca	16,8	7,28	6,0	16,0	4,4	4,7
	19,3	9,3	5,1	11,9	5,7	4,1
	17,8	7,0	5,6	10,7	7,5	4,5
Na	2,86	1,57	1,03	2,36	1,30	1,31
	2,94	1,59	0,95	1,92	1,39	1,15
	2,98	1,33	0,92	2,62	0,91	0,94
P	84,0	43,4	30,6	77,9	33,0	24,0
	85,1	49,5	26,4	62,9	36,3	18,9
	85,2	44,2	23,5	55,4	36,0	12,0

Rezultatele reprezintă media a trei experiențe complete.

componentele cuprinse în ea. Prin stoarcere, acestea se elimină o dată cu sucul vacuolar modificîndu-i compoziția. De aceea sucul obținut prin stoarcerea frunzelor proaspete de porumb tratate cu inhibitori metabolici este în cantitate mai mare și conține de asemenea o cantitate sporită de ioni de potasiu, calciu, sodiu și fosfor anorganic, față de sucul vacuolar martor.

Tabela 3

Cantitatea de suc (ml), concentrația și conținutul ionilor de potasiu, calciu, sodiu, precum și de fosfor anorganic din sucurile obținute prin stoarcerea la 150 at atît a frunzelor proaspete de porumb, tratate cu apă (proba martor) și cu soluții de zaharoză (Z) și alanină (Ala), de concentrație 10^{-2}M, cît și a celor obținute din reziduurile acestor frunze după omorire cu vapori de cloroform timp de 24 h.

Sucurile din frunze proaspete de porumb

Componentul determinat	Metoda de vacuum-infiltrație			Metoda capilară		
	Frunze martor	Z	Ala	Frunze martor	Z	Ala
Suc, ml	19	18	19	17	18	17
Concentrația componentelor în suc (mg/100 ml)						
K	98	102	102	80	82	86
Ca	22	18	22	20	18	18
Na	3,0	2,4	2,8	2,4	2,2	2,0
P	6,6	7,0	6,6	7,2	6,9	7,4
Cantitatea totală de componente din sucul stors (mg)						
K	18,6	18,4	19,4	13,6	14,8	14,6
Ca	3,8	3,2	4,4	3,4	3,2	2,1
Na	0,57	0,43	0,53	0,41	0,40	0,34
P	12,5	12,6	12,5	12,2	12,6	12,4
Sucurile din reziduu după omorîre cu cloroform						
Suc, ml	23	22	22	20	21	20
Concentrația componentelor în suc (mg/100 ml)						
K	290	286	290	270	264	268
Ca	26	24	23	20	22	24
Na	6,4	6,3	6,2	5,4	5,2	6,0
P	355	345	345	340	345	345
Cantitatea totală de componente din sucul stors (mg)						
K	66,7	62,9	63,8	54,0	55,4	53,6
Ca	6,0	5,3	5,1	4,0	4,6	4,8
Na	1,47	1,36	1,39	1,08	1,09	1,00
P	80,5	75,9	75,9	68,0	72,5	69,0

Trecînd la analiza datelor prezentate în tabela 2, se constată că, și într-un caz și într-altul (vacuum-infiltrație sau metoda capilară), atît cantitatea de suc, cît și concentrația componentelor cercetate din sucul plasmatic obținut prin stoarcerea reziduurilor rămase de la frunzele tratate cu inhibitori și omorîte cu vapori de cloroform, sînt mai mici față de valorile găsite în sucul plasmatic martor. Într-adevăr, rezultatele obținute prin analiza sucului plasmatic martor reprezintă apa și componentele eliberate din toată materia cuprinsă în biostructură, care s-a destrămat prin omorîre, în timp ce sucul plasmatic modificat [6] conține numai apa și componentele rămase în acea parte a biostructurii care nu s-a destrămat sub acțiunea inhibitorilor metabolici.

În cazul utilizării azidei de sodiu ca inhibitor, valorile obținute pentru concentrația și cantitatea componenților menționați sînt mai mari decît cele obținute prin tratarea cu 2,4-dinitrofenol. Aceasta se explică, în parte, datorită pătrunderii în țesutul foliar a ionilor de sodiu din azida introdusă în frunze (tabelele 1 și 2).

Rezultatele prezentate în tabela 3 arată că, folosind soluții de zaharoză și alanină se obțin sucuri cantitativ și calitativ corespunzătoare celor obținute din frunzele și reziduurile martor, deoarece aceste soluții nu prezintă însușiri de inhibitori metabolici și, deci, nu destramă biostructura.

Folosind soluții de zaharoză și alanină în concentrațiile de 2.10^{-2}M sau 4.10^{-2}M s-au obținut practic aceleași rezultate ca și în cazul utilizării soluțiilor de concentrația 10^{-2}M. Aceasta demonstrează că, în concentrațiile folosite de noi, substanțele de acest fel nu provoacă destrămarea biostructurii, deoarece se întîlnesc curent în celulă.

De asemenea s-a constatat că lucrînd fie pe porumb HS 301, fie pe porumb HS 409, rezultatele obținute au fost în toate cazurile practic aceleași. Prin urmare, substanțele utilizate exercită asupra țesutului foliar viu aceeași acțiune, indiferent de hibridul folosit.

Rezultatele obținute de noi cu privire la acțiunea inhibitorilor metabolici asupra biostructurii foliare sînt în concordanță cu cele obținute anterior de alți cercetători [1], care au folosit pentru introducerea inhibitorilor metabolici în țesutul foliar viu metoda absorbției.

CONCLUZII

— În prezența inhibitorilor 2,4-dinitrofenol și azidă de sodiu, introduși în țesutul foliar viu fie prin vacuum-infiltrație, fie prin metoda capilară, se eliberează din biostructură o parte din apa asimilată și din ionii de potasiu, calciu, sodiu, precum și fosfor anorganic, care se adaugă la cantitatea sucului vacuolar martor.

— Reziduurile omorîte rămase de la frunzele tratate cu inhibitori dau cantități de suc și de ioni de potasiu, calciu, sodiu și fosfor anorganic mai mici decît cele obținute din sucul plasmatic martor, indiferent de metoda folosită pentru introducerea inhibitorilor metabolici în țesutul foliar.

— Dacă se utilizează substanțe care nu prezintă însușiri de inhibitori metabolici, se obțin rezultate asemănătoare cu cele obținute pentru probele martor.

— Vacuum-infiltrația nu lezează țesutul foliar viu, cu toate că în timpul prelucrării frunzele sînt puse în condiții anormale de existență. Într-adevăr în timpul vacuum-infiltrației aerul din spațiile aerifere intercelulare ale frunzei este înlocuit cu soluții care vin direct în contact cu celulele vii ale țesutului foliar, ceea ce nu se produce în condițiile normale de existență a frunzei.

Prezentată la redacție la 1 iulie 1971

Catedra de biochimie,
Facultatea de biologie,
Universitatea București

BIBLIOGRAFIE

1. E. Macovschi, V. Frunzeti, St. cerc. biochim., **12**, 19 (1969).
2. A. N. Belozerskii, I. N. Proscuriakov, *Prakticeskoe rukovodstvo po biohimii rastenii*, Gosudarstvennoe izdatelstvo Sovetskaia Nauka, Moskva, 1951, p. 293–297.
3. E. Macovschi, Comunicările Acad. R. P. R., **8**, 183 (1958).
4. H. Goldengerg, A. Fernandez, Clin. Chemistry, **12**, 12 (1966).
5. E. Macovski, *Biostructura*, Edit. Academiei Bucureşti, 1969.
6. I. Cornoiu, St. cerc. biochim., **14**, 17 (1971).

POTASSIUM, CALCIUM, SODIUM AND INORGANIC PHOSPHORUS RELEASED FROM THE BIOSTRUCTURE OF CORN FOLIAR TISSUE BY METABOLIC INHIBITORS

SUMMARY

Investigations carried out on saps of corn leaves proved that the action of metabolic inhibitors on the foliar biostructure does not depend on the method by which they are introduced in to the foliar tissue. Thus, using either the vacuum infiltration or the capillary methods, similar results were obtained concerning the concentration and amount of potassium, calcium, sodium, inorganic phosphorus from vacuolar and plasmatic saps, as compared to those obtained by the absorption method. It was proved that vacuum infiltration does not damage the foliar tissue although during the processing leaves are put into abnormal existence conditions, because their aeriferous intracellular spaces are full of solutions.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 4, 433–438 (1971)

ACȚIUNEA FRACȚIUNILOR DE FOSFOLIPIDE DIN SEMINȚE DE FLOAREA-SOARELUI (*HELIANTHUS ANNUUS* L.) ASUPRA METABOLISMULUI LIPIDIC LA ȘOBOLANI

M. SIMIONOVICI, I. A. MOLNAR, J. WINTER, N. BOEȘTEANU, E. TUCICOV, Y. CRISTESCU

Rezumat. — Din fosfolipidele totale ale seminţelor de floarea-soarelui s-au separat fracţiunile solubile şi insolubile în alcool. Fosfolipidele totale şi fracţiunile au fost analizate chimic şi prin cromatografie în strat subţire. Fracţiunea insolubilă nu s-a pretat pentru separarea cromatografică. Compoziţia procentuală a celor 6 fracţiuni fosfolipidice separate prin cromatografie în strat subţire, raportate la conţinutul total de fosfor (în fosfolipidele totale şi în fracţiunea solubilă în alcool) a fost, în ordinea migrării, următoarea : fracţiune neidentificată (3,0 ; 2,5), cefaline B(2,9 ; 1,1), cefaline A (13,2 ; 14,0), lizocefaline (18,5 ; 1,8), lecitine (45,5 ; 52,4), lizolecitine (10,5 ; 27,8), fracţiunea rămasă pe start (6,0 ; 9,8). Fracţiunea solubilă nu conţine fosfatidilinozitide. S-a studiat acţiunea protectoare a fracţiunilor de fosfolipide solubile şi insolubile în alcool, comparativ cu fosfolipidele totale, în hiperlipidemia experimentală la şobolani, provocată prin regim alimentar hiperlipidic. S-a constatat că fracţiunea solubilă în alcool, bogată în fosfatidilcolină, cît şi cea insolubilă, săracă în fosfatidilcolină dar bogată în fosfatidilinozitide, precum şi fosfatidele totale au o acţiune protectoare asemănătoare faţă de creşterea turbidităţii plasmei, hiperlipidemiei şi a hipercolesterolemiei experimentale. Rezultatele arată că în cazul fosfolipidelor din floarea-soarelui, pentru obţinerea unui produs activ nu este necesară separarea fracţiunii solubile în alcool.

Aproape toate fosfolipidele au acţiune hipocolesterolemiantă, hipolipemiantă şi protejează degenerescenţa grasă a ficatului la animalele de experienţă cu hiperlipidemie experimentală. Dar mai mulţi autori au arătat că nu întotdeauna există un paralelism între aceste acţiuni. Astfel, de exemplu, lecitina obţinută din ouă de raţă nu are efect hipocolesterolemiant [5], iar fosfatidiletanolamina are chiar un efect antagonist faţă de acel al fosfatidilcolinei [6], [7]. Maurakas şi colab. [14] folosind dihexanoil-fosfatidiletanolamină sintetică, nu au obţinut efect asupra lipidelor plasmatice la iepuri supuşi unui regim alimentar bogat în ulei de bumbac şi colesterol, însă au obţinut scăderea colesterolului în ficat. Un număr mare de autori [8] — [12] au studiat acţiunea fracţiunii solubile în alcool

a fosfolipidelor din soia, fracţiune foarte bogată în fosfatidilcolină şi în acizi graşi polienici, ca acizii arahidonic şi linolic, şi atribuie acestei fracţiuni proprietăţi farmacologice deosebite, denumind-o fosfolipide esenţiale (E.P.L.).

În urma acestor rezultate, aceste fosfolipide au găsit aplicare în terapia hipercolesterolemiei şi a diferitelor boli hepatice. Pe de altă parte, Van Handel [13] a constatat că la iepuri cu ateromatoză experimentală prin administrare de colesterol efectul protector asupra ateromatozei a fracţiunilor solubile şi insolubile în alcool a fosfolipidelor din soia este asemănător, iar colesterolemia plasmatică a lotului tratat cu fracţiunea insolubilă este mai mică. Din aceste indicaţii rezultă că acţiunea farmacologică a unui amestec de fosfolipide depinde de proporţia fracţiunilor fosfolipidice, de proporţia şi natura acizilor graşi şi probabil şi de alţi factori.

Acţiunea farmacologică a unor amestecuri de fosfolipide sau a unor fracţiuni care, la rîndul lor, sînt tot amestecuri nu poate fi apreciată a priori.

În continuarea studiului acţiunii fosfolipidelor totale din seminţe de floarea-soarelui (*Helianthus annuus* L.) [4], în prezenta lucrare am studiat acţiunea fracţiunilor solubile şi insolubile în alcool asupra lipidelor plasmatice, în comparaţie cu fosfolipidele totale.

MATERIAL ŞI METODE

Fosfolipidele totale din seminţe de floarea-soarelui folosite de noi în lucrările anterioare [4] au fost fracţionate prin dizolvare la rece în alcool etilic. Fracţiunea solubilă reprezintă circa 32% din total. Pentru caracterizarea fosfolipidelor totale şi a fracţiunilor am efectuat diferite determinări chimice : fosforul total, azotul total, indicele de aciditate şi de iod, acizii graşi totali, zaharurile reducătoare şi inozitolul, au fost determinate prin metode analitice curente. Separarea fracţiunilor lipidice şi determinarea lor cantitativă s-a efectuat prin cromatografie în strat subţire, pe plăci de Kieselgel G., de 10 × 20 cm, după metoda lui Wagner [1] modificată de Winter şi Molnar [2]. La fracţiunea insolubilă în alcool nu am putut obţine separarea fracţiunilor nici după modificarea proporţiei de solvenţi. Pentru identificarea fracţiunilor de fosfolipide s-au folosit reactivi specifici ca : ninhidrină, molibdat de amoniu, triclorură de antimoniu, rezorcină.

Pe baza reacţiilor de identitate şi cunoscînd ordinea migrării componenţilor din lucrările lui Wagner [1] Angelelli şi colab. [3], s-a identificat natura componenţilor.

Fosfolipidele totale şi cele două fracţiuni, solubilă şi insolubilă în alcool, au fost utilizate pentru determinările farmacologice. În acest scop am folosit loturi de cîte 6 — 8 şobolani de rasă Wistar, masculi în greutate de 200 — 250 g. Animalele au fost împărţite în 5 loturi.

Pentru a provoca hipercolesteremia şi hiperlipidemia experimentală s-a folosit un regim hiperlipidic, sărac în proteine, avînd 20% lipide, 1,33% colesterol, 0,13% metiltiouracil, şi numai 8,5% proteine. Lotul martor a primit regimul alimentar de bază, lotul 2 regimul hiperlipidic iar loturile 3, 4 şi 5 regim hiperlipidic şi fosfolipide.

Fosfolipidele au fost administrate zilnic, prin gavaj, cîte 0,5 ml dintr-o emulsie apoasă de 3% corespunzătoare la 15 mg fosfolipide pentru 100 g corp. La sfîrşitul perioadei de experimentare de 4 săptămîni animalele au fost sacrificate şi s-au determinat densitatea optică, colesterolul şi lipidele totale ale plasmei.

Compoziţia regimului alimentar, metodele analitice folosite şi modul de interpretare a rezultatelor au fost descrise într-o lucrare anterioară [4].

Densitatea optică reprezintă extincţia plasmei determinată spectrofotometric la 610 m μ în cuva de 1 ml. Efectul produsului a fost exprimat în efectul protector calculat după formula

$$Ep\% = 100 - \frac{T - C}{I - C} \times 100,$$

în care E este efectul protector, T valoarea medie obţinută la animalele tratate cu fosfolipide, C valoarea medie obţinută la animalele martor netratate iar I valoarea medie obţinută la animalele care au primit regim hiperlipidic.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele analizelor chimice ale fracţiunilor solubile şi insolubile ale fosfolipidelor totale sînt trecute în tabelele 1 şi 2. Prin metoda cromatografică folosită s-au separat 6 fracţiuni de fosfolipide şi una care rămîne

Tabela 1

Principalii indici analitici ai fosfolipidelor din seminţe de floarea-soarelui

	Fosfolipide totale	Fracţiunea solubilă în alcool	Fracţiunea insolubilă în alcool
P total %	2,91	2,91	2,98
N total %	1,08	1,38	0,855
Raport molar P/N	1,22	0,976	1,606
Indice de iod	68,7	89,9	50,4
Indice de aciditate	36,1	39,8	32,6
Acizi graşi totali %	56,4	58,6	52,6
Insaponifiabil %	1,79	1,76	1,10
Zahăr reducător (expr. în glucoză)	4,8	1,4	6,1
Inozitol	prezent	absent	prezent
Reziduu la calc. %	8,04	6,53	10,48
Pierderi la uscare la 105° %	1,46	1,14	4,03

pe start. Raportul molar P/N, foarte ridicat în fracţiunea insolubilă, arată proporţia mare de fosfatidilinozitide; totalitatea inozitolului se găseşte deci în această fracţiune. Este interesant că ambele fracţiuni conţin zaha-

Tabela 2

Repartiţia procentuală a fosforului total între diferite componente ale fosfolipidelor din seminţele de floarea-soarelui

Nr. crt.	Fracţiunea	Val. aprox. de R. f.	P % din P total	
			Fosfolipide totale	Fracţiunea solubilă în alcool
1	Steroid	0,87—0,91	—	—
2	Steroid	0,81—0,85	—	—
3	?	0,71—0,77	3,0	2,5
4	Cefaline B	0,63—0,65	2,9	1,1
5	Cefaline A	0,58—0,62	13,22	4,0
6	Lizocefaline	0,42—0,52	18,5	1,8
7	Lecitină	0,28—0,39	45,5	52,4
8	Lizolecitine	0,12—0,17	10,5	27,8
9	Start	—	6,0	9,8

ruri reducătoare, ceea ce arată că, în afară de fosfatidilinozitide care conţin hidraţi de carbon, în produsele analizate mai există şi alte lipide care conţin hidraţi de carbon; acestea ar putea fi cerebrozide. În fosfolipidele analizate nu am găsit gangliozide şi sfingomieline.

Rezultatele farmacologice obţinute cu produsele caracterizate mai sus sînt trecute în tabela 3. Ele arată că atît fracţiunea solubilă în alcool,

Tabela 3

Modificările lipidelor plasmatice sub influenţa tratamentului cu fosfolipide concomitent cu regim hiperlipidic timp de 4 săptămîni

Lot	Nr. de animale	Tratament	D.O.		Lipidemie totală		Colesterol total	
			găsit	efect protector %	mg/100 ml	efect protector %	mg/100 ml	efect protector %
1	6	Regim alim. de bază	0,06	—	745	—	87,8	—
2	6	Regim hiperlipidic	1,00	—	2.386	—	254,6	—
3	7	Regim hiperlipidic şi fosfolipide totale	0,61	41,4	1.737	99,5	154,4	66,5
4	7	Regim hiperlipidic şi fracţiunea de fosfolipide insolubilă în alcool	0,55	47,8	1.454	56,7	206,5	28,8
5	8	Regim hiperlipidic şi fracţiunea de fosfolipide solubilă în alcool	0,70	31,9	1.354	62,8	169,6	38,9

cît şi cea insolubilă, prezintă efect protector faţă de creşterea turbidităţii plasmei, a hiperlipidemiei şi hipercolesterolemiei plasmatice, provocată de regimul alimentar hiperlipidic. Protecţia observată pe cele trei teste la loturile tratate cu fracţiunea solubilă în alcool, cu cea insolubilă şi cu fosfolipidele totale, este apropiată. De aici rezultă că pentru protejarea

hiperlipidemiei experimentale nu este neapărat nevoie de fosfatidilcoline, fiindcă celelalte fracţiuni de fosfolipide posedă de asemenea această proprietate.

În consecinţă, pentru a obţine fosfolipide hipolipemiante şi hipocolesterolemiante din seminţe de floarea-soarelui, nu este necesară fracţionarea lor.

CONCLUZII

Prin cromatografia în strat subţire din fosfolipidele totale din seminţele de floarea-soarelui şi din fracţiunea solubilă în alcool se pot separa 6 componente fosfolipidice. Fracţiunea insolubilă în alcool nu s-a putut separa prin cromatografie în sistemele folosite.

Caracteristic pentru fosfolipidele totale este raportul molar P/N relativ ridicat, explicat prin prezenţa fosfatidilinozitidelor. Fracţiunea insolubilă în alcool are raportul molar P/N şi mai mare şi conţine totalitatea inozitidelor. Fracţiunea solubilă are un raport P/N puţin sub 1, ceea ce arată prezenţa unor lipide complexe care nu conţin fosfor.

În ceea ce priveşte acţiunea farmacologică, fracţiunea de fosfolipide solubilă în alcool, ca şi cea insolubilă, prezintă efect protector faţă de creşterea turbidităţii plasmei, a lipidemiei totale şi a colesterolemiei plasmatice provocată de regimul alimentar hiperlipidic.

Acţiunea protectoare a două fracţiuni şi a fosfolipidelor din seminţe de floarea-soarelui este sensibil egală; în consecinţă pentru obţinerea preparatelor active nu este necesară separarea fracţiunii solubile în alcool.

Prezentată la redacţie la 5 aprilie 1971

Institutul de cercetări chimico-farmaceutice,
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. H. Wagner, Fette, Seife, Anstrichmittel, **61**, 1115 (1960).
2. J. Winter, I. Molnar, A II-a Conferinţă republicană de chimie fizică generală şi aplicată, Bucureşti, **2**, 227 (1970).
3. I. Angelelli, G. Gavine, G. Morretti, P. Siniscalchi, Il Farmaco, Ed. Practica, **21**, 493 (1966).
4. J. Winter, M. Simionovici, N. Boeşteanu, A. Cîrstea, E. Tucicov, M. Tocuşan, I. Molnar, St. cerc. biochim., **14**, 99(1971).
5. M. Friedman, Am. J. Chim. Nutrition, **8**, 318 (1960).
6. N. F. Mac. Lagan, C. Howel, J. D. Billimoria, J. Lipid. Res., **7**, 242 (1966).
7. J. D. Billimoria, C. Howel, N. F. Mac. Lagan, J. Biochem., **96**, 5 (1965).
8. S. Byers, M., Friedman, J. Lipid Res., **1**, 343 (1960).
9. W. Rohrschneider, Med. Clin., **53**, 782 (1958).
10. C. W. M. Adams, O. B. Bayliss, M. Z. M. Ibrahim, N. W. Webster, J. Pathol. Bacteriol., **86**, 431 (1963).
11. L. Samokiewiec, Z. Steplenski, J. Wojcicki, Arch. Imunol., ther. exp., **15**, 745 (1967).
12. L. Samokiewiec, J. Wojcicki, K. Dominiczak, Arzneimittelforschung, **17**, 1374 (1967).
13. E. Van Handel, J. Nutrition, **53**, 782 (1958).
14. J. B. Maurakas, C. V. Pillmer, Holland Atherosclerosis Res., **6**, 389 (1966).

THE INFLUENCE OF PHOSPHOLIPID FRACTIONS FROM SEEDS OF *HELLIANTHUS ANNUUS* L. ON LIPID METABOLISM IN RATS

SUMMARY

Out of the total phospholipids, from *Hellianthus annuus* L. the alcohol-soluble and alcohol-insoluble fractions have been separated. Both total pospholipids and fractions have been analysed chemically and by thin layer chromatography. The insoluble fraction could not be separated by chromatography. The per cent composition of the six phospholipid fractions separated by thin layer chromatography — as referred to the total amount of phosphorus (total phospholipids and alcohol soluble fractions) — in the migration order, was the following : unidentified fraction (3.0 ; 2.5) cephalines B (2.9 ; 1.1), cephalines A (13.2 :14.0), lysocephalines (18.5 ; 1.8), lecithines (45.5 ; 52, 4), lysolecithines (10.5 ; 27.8) and the start remaining fraction (6.0 ; 9.8). The soluble fraction is free of phosphatidyl inositides.

It was studied the protective activity of the alcohol-soluble and alcohol-insoluble phospholipidic fractions as compared to total phospholipids, in rat experimental hiperlipidemia induced by a hiperlipidic diet.

It was found that both alcohol-soluble fractions rich in phosphatidylcholines and the alcohol-insoluble ones with a lower content of phosphatidylcholines but rich in phosphatidylinositides, as well as the total phospholipids have a similar protective effect against the increase in plasma turbidity, hyperlipidemia and experimental hypercholesterolemia.

These findings show that an active product can be obtained from phospholipids of *Hellianthus annuus* without any separation of the alcoholic fraction.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 4, 439–444 (1971)

INFLUENȚA DISULFURII DE TETRAMETILTIURAM (TMTD) ASUPRA CONCENTRAȚIEI ELECTROLIȚILOR DIN PLASMĂ LA ȘOBOLAN

ADELA ȘTEFAN și CRISTIANA RĂDULESCU

Rezumat. — S-a cercetat acțiunea tratamentului semințelor cu TMTD asupra electroliților din plasmă la șobolanii care au consumat aceste semințe. S-au constatat următoarele : proteinele scad după 30 respectiv 72 de zile de alimentație de la 20 — 16,6 și de la 20,4 — 16,5 μEq/l ; sodiul — 164,08 — 157, 63 și 158,99 — 145,16 ; potasiul — 9,94 — 6,99 și 7,78 — 5,63 ; calciul — 5,50 — 5,06 și 5,15 — 4,45 ; ionul fosfat de la 3,16 — 1,80 și 3,12 — 1,74 μEq/l ; ionul clor nu suferă modificări.

Disulfura de tetrametiltiuram (TMTD) este un fungicid cu o largă utilizare pentru combaterea numeroaselor ciuperci care infectează plantele de cultură și semințele lor, producînd diferite boli.

Utilizarea acestui produs a arătat că deși toxicitatea lui este redusă, în comparație cu a altor fungicide, totuși el produce, în timp, unele efecte negative la plante sau la animalele care au consumat plantele tratate sau produsele lor. În literatură se citează că TMTD în concentrație de numai 35 p. p. m. produce la păsări o reducere sensibilă a producției de ouă și o scădere a calității acestora (decalcifiere) [5]. Cantitatea cuprinsă între 740 și 2000 mg/kg corp TMTD are ca efect la șoareci tulburări ale sistemului nervos, cu tulburări ale locomoției și o scădere treptată a eosinelor [1].

Pentru a cunoaște mecanismul acestor modificări biochimice în organismul animalelor am urmărit modul în care acest fungicid influențează concentrația electroliților din sîngele șobolanilor intoxicați.

MATERIAL ȘI METODE

S-au luat două loturi de cîte 20 șobolani Albino, în greutate medie de 100 g. Fiecare lot a fost împărțit în două grupe a cîte 10 șobolani ; o grupă (control) a primit ca regim alimentar un amestec de morcov, lapte, pîine și ovăz, iar cea de a doua aceeași alimentație, cu deosebirea că ovăzul a fost tratat în prealabil cu TMTD 0,2 %. Cantitatea de ovăz administrată zilnic a fost de 25 g pe grupă (5 mg TMTD /individ).

Primul lot a fost sacrificat prin decapitare după 30 zile de la administrarea hranei speciale. S-a recoltat sîngele carotidian de la cele două grupe și s-au făcut următoarele determinări : proteinele plasmatice, sodiu, clor, potasiu, calciu și fosfat anorganic.

Pentru analiza proteinelor s-a folosit metoda Lowry [4].

Dozarea sodiului, potasiului și calciului s-a făcut prin metoda fotometriei de flacără a lui Lungegartz și Schuhknecht [2].

Dozarea clorului s-a efectuat după metoda lui Mohr, constînd în deproteinizarea serului cu alcool și dozarea clorurilor cu $AgNO_3$ în prezența K_2CrO_4.

Pentru dozarea fosforului s-a folosit metoda lui Goldengerg și Fernandez [3], care se bazează pe reducerea fosfomolibdatului de amoniu de către ionii feroși, în oxid de molibden colorat în albastru. Extincția s-a citit la spectrofotometrul Beckman B, la 660 mμ.

Cu cel de-al doilea lot de animale s-a procedat în mod similar, cu deosebirea că sacrificarea s-a efectuat după 72 de zile de alimentare în condițiile specificate pentru primul lot.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Urmărind timp de 30 și respectiv 72 de zile cele două loturi alese pentru experimentare, am constatat, ca și Agave [1], că animalele hrănite cu hrană intoxicată manifestă tulburări nervoase.

Analizele biochimice efectuate, ale căror rezultate sînt prezentate în tabela 1 și figurile 1—3, au permis să se evidențieze următoarele modificări ale componentelor analizate :

Tabela 1

Conținutul electroliților plasmatici la șobolani hrăniți cu ovăz intoxicat cu TMTD

Electroliți	Control	Probă	Control	Probă
	30 zile		72 zile	
Na^+	164,08 ±0,5	157,63 ±0,2	158,99 ±1,06	145,16 ±0,5
K^+	9,94 ±0,14	6,99 ±0,4	7,78 ± 0,21	5,63 ±0,2
Ca^{2+}	5,50 ±0.02	5,06 ± 0,01	5,15 ± 0,18	4,45 ±0,1
Cl^-	104 ±3	104 ±1	105 ± 0,1	104 ±1
PO_4^{2-}	3,16 ±0,3	1,80 ± 0,01	3,12 ± 0,3	1,74 ±0,01
Proteine	20 ±0, 1	16,6 ± 0,02	20,4 ± 0,7	16,5 ±0,01

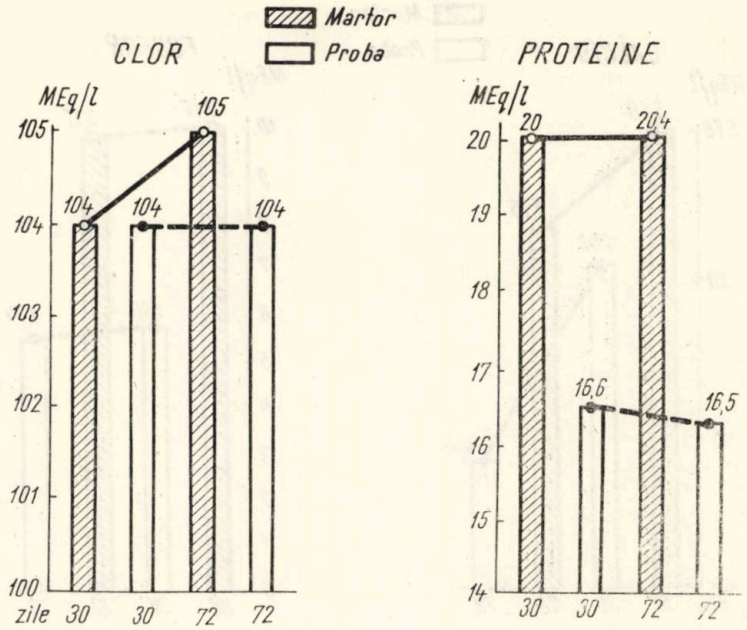


Fig. 1. — Variaţia clorului şi proteinelor plasmatice la şobolani intoxicaţi cu TMTD.

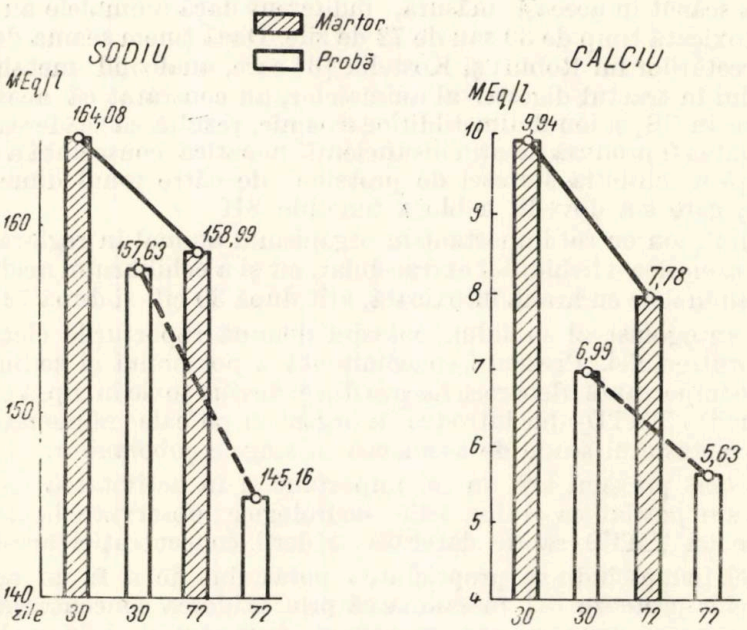


Fig. 2. — Variaţia sodiului şi potasiului plasmatic la şobolani intoxicaţi cu TMTD.

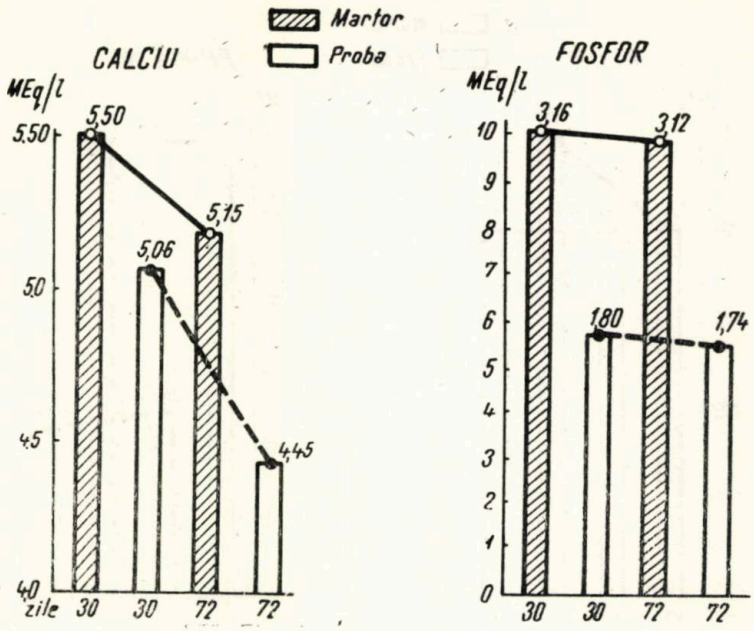


Fig. 3. — Variaţia calciului şi fosforului plasmatic la şobolani intoxicaţi cu TMTD.

— Concentraţia proteinelor plasmatice la şobolanii intoxicaţi cu TMTD a scăzut în aceeaşi măsură, indiferent dacă animalele au primit hrana intoxicată timp de 30 sau de 72 de zile. Dacă ţinem seama de rezultatele cercetărilor lui Robins şi Kostelik [6] care, analizînd metabolismul TMTD-ului în tractul digestiv al animalelor, au constatat că acesta este descompus în CS_2 şi ionul dimetilditiocarbamic, rezultă că scăderea proteinelor ar putea fi produsă fie prin insuficienţă hepatică, consecinţă a acţiunii CS_2, fie prin inhibiţia sintezei de proteine de către ionul dimetilditiocarbamic, care s-a dovedit a bloca funcţiile SH.

Sodiul, ion cu rol important în organismul animal în reglarea atît a presiunii osmotice a lichidului extracelular, cît şi a echilibrului acido-bazic, scade la animalele cu hrană intoxicată, atît după 30 cît şi după 72 de zile.

Ca antagonist al sodiului, potasiul domină raporturile electrolitice în interiorul celulei. Prezenţa concomitentă a potasiului şi sodiului este extrem de importantă, deoarece fiecare din ei devine toxic în lipsa celuilalt. Sub influenţa TMTD-ului introdus în organism pe cale alimentară, concentraţia potasiului scade de asemenea în sîngele şobolanilor.

Întrucît potasiul are un rol important şi în activitatea sistemului nervos, este posibil ca tulburările neurologice observate la animalele intoxicate cu TMTD să fie datorate scăderii concentraţiei acestui ion. Tot astfel, cunoscîndu-se proprietatea potasiului de a fi un activator al diferitelor proteaze [8], înseamnă că prin scăderea concentraţiei lui în sînge activitatea unor proteaze se reduce, fapt atestat şi de modificările semnalate la nivelul proteinelor plasmatice. Aceasta ar fi a treia ipoteză a noastră asupra cauzei scăderii proteinelor sangvine.

Calciul sangvin se găsește, după cum se știe, în proporție de 60% legat de proteine, în special de albumine (calciul coloidal nedifuzabil), o mică parte se află sub formă neionizată, greu difuzibilă, și 36% sub formă ionizată, ușor difuzibilă.

În experiențele noastre, prin alimentația animalelor cu hrană tratată cu TMTD se constată, de asemenea, o scădere a concentrației acestui cation. Scăderea concentrației ionului de calciu, ca și aceea a concentrației ionilor de sodiu și potasiu, este explicabilă prin proprietatea ditiocarbamaților de a lega acest ion [5].

Deoarece în organismul animal metabolismul fosforului este legat de cel al calciului, așa cum era de așteptat, concentrația ionului fosfat a scăzut la animalele de experiență. Dacă se ține seama că fosforul și calciul au rol important în formarea ouălor la păsări, scăderea acestor substanțe în sîngele lor, după ingerarea unei hrane tratate cu TMTD, ar putea explica și scăderea producției lor de ouă în acest caz (fenomen ce nu a fost explicat pînă în prezent).

Ionii de clor, sodiu și potasiu au un rol major în menținerea și reglarea presiunii osmotice și a pH-ului sangvin. În sîngele șobolanilor intoxicați cu TMTD nu au fost observate modificări ale concentrației ionului de clor, acesta menținîndu-se la o valoare medie de 104 MEq/l (practic egală cu aceea a martorului), la ambele loturi de animale din experimentul nostru.

Această rezistență a ionului de clor față de substanțe toxice a mai fost constatată și de alți autori, printre care Love și Burch [7], care au urmărit influența $NaNO_3$, NaF și $HgCl_2$ asupra concentrației clorului din plasma și eritrocitele din sîngele de om.

CONCLUZII

Animalele hrănite cu alimente tratate cu disulfură de tetrametiltiuram (TMTD), în concentrația folosită pentru scopuri practice (fungicid), prezintă grave tulburări ale concentrației proteinelor și altor electroliți din plasmă. Aceste tulburări apar după o perioadă relativ scurtă de ingerare a unei astfel de hrane și explică, cel puțin în parte, simptomatologia clinică a animalelor intoxicate.

Aceste observații impun reconsiderarea folosirii acestei substanțe în scopurile practice menționate.

Prezentată la redacție la 23 martie 1971

Catedra de biochimie, Facultatea de biologie, Universitatea București și Laboratorul de patologie experimentală, transplantare de organe și investigații clinice speciale, Spitalul clinic Fundeni

BIBLIOGRAFIE

1. I. M. Agaeva, Pest. Klin. Otravleni, 4, 163 (1966).
2. I. Alteras, N. Cajal, I. Cojocaru, S. Comoroșan, P. Dăncescu, T. Ieremia, V. Kondi, N. Mitrică, *Metodele laboratorului clinic*, Edit. medicală, București, 1964, p. 32.
3. H. Goldengerg, A. Fernandez, Clinical Chemistry,12 , 12 (1966).

4. H. O. Lowry, N. J. Rosenbrough, L. A. Farr, A. Randall, J. Biol., Chem. **193**, 265 (1951).
5. C. Popa, Rodica Drimuş, *Chimia produselor fitofarmaceutice*, Edit. tehnică, Bucureşti 1965, p. 259.
6. Ralph C. Robbins, Joe Kostelik, Journal Ag. Food. Chem., **9**, 256 (1961).
7. W. D. Love, G. E. Burch, Proceedings of the society for experim. biology and medicine, **82**, 1, 131 (1953).
8. A. White, P. Handles, E. Smith, *Principles of Biochemistry*, The Blakiston Division. Mc Graw-Hill Book Company, New York, Fourth Edition, 1968, p. 131.
9. Fr. Mohr, Ann., **97**, 335 (1856).

THE INFLUENCE OF TETRAMETHYLTIURAM DISULPHIDE UPON ELECTROLYTE CONCENTRATION IN RAT PLASMA

SUMMARY

The action of TMTD-treated seeds upon plasma electrolytes in rats was studied. After 30 and 72 days, respectively from the beginning of the seed diet, proteins decrease from 20 down to 16.6, and 20.4 down to 16.5 μEq/1, respectively; sodium level decreases from 164.08 down to 157.63, and 158.99 down to 145.16 μEq/1, respectively; potassium level decreases from 9.94 down to 6.96, and 7.78 down to 5.63 μEq/1, respectively; calcium level decreases from 5.50 down to 5.06, and 5.15 down to 4.45 μEq/1, respectively; PO_4 level decreases from 3.16 down to 1.80, and 3.12 down to 1.74 μEq/1, respectively; no changes were found in chloride ion concentration.

ST. CERC. BIOCHIM., 14, 4, 445–455 (1971)

INTERACȚIUNEA DINTRE ENZIME ȘI SUBSTRATELE LOR IRADIATE

S. VIERU, P. MURGOCI, D. ȘANDRU, M. CRU, D. CRIȘAN și S. COMOROȘAN

Rezumat. — Prezentăm în această lucrare un nou mod de abordare a studiului unor fenomene fizice implicate în interacțiunea dintre un cîmp electromagnetic și moleculele substratului unei reacții enzimatice. Acest nou tip de investigare presupune utilizarea unui instrument de natură biologică, respectiv macromolecula enzimatică. Astfel, substratele reacțiilor enzimatice au fost iradiate, proces ce induce o tranziție S→S*. Au fost determinate efectele acestei tranziții asupra vitezei reacției enzimatice. Creșterea vitezei de reacție astfel indusă și dependența de o serie de parametri fizici ca : lungimea de undă a radiației utilizate, intensitatea iradierii, polarizarea luminii, au fost investigate. S-a înregistrat un tip special de tranziție S→S*, a cărei principală caracteristică este timpul de viață deosebit de lung.

Interacțiunea specifică dintre o enzimă E și substratul corespunzător S poate fi abordată din punct de vedere cuantic teoretic, concept propus de noi recent [1]. Conform acestui nou mod de abordare a interacțiunii enzimă-substrat, s-a construit un model matematic care poate prevedea fluctuațiile cineticii reacției enzimatice, în funcție de „perturbarea" substratului S. Modalitatea experimentală de realizare a perturbării substratului unei reacții enzimatice este iradierea sa cu un cîmp electromagnetic [2]. Aplicînd această nouă tehnică de perturbare a substratului, descrisă de noi, s-au obținut o serie de rezultate neașteptate și anume : fluctuațiile înregistrate în cinetica reacției enzimatice, cînd substratul este iradiat, prezintă o regularitate deosebită. Rezultatele noastre experimentale pot astfel releva un nou tip de mecanism de control [3]. Acest mecanism s-a dovedit că operează în secvențe metabolice lungi [4]. Aceste dovezi experimentale de o factură particulară ridică două probleme : natura efectului perturbării și natura fizico-chimică a fenomenului de perturbare. Astfel, devine în primul rînd necesară investigarea efectului perturbării substratului S (realizată prin iradiere și notată de noi ca S→S*) asupra reacției enzimatice corespunzătoare și specifice. În al doilea rînd devine necesară elucidarea modificărilor fizico-chimice implicate în tranziția S→S* produsă prin perturbarea substratului. Dovezile experimentale rezultate din investigarea acestor două aspecte constituie obiectul prezentului studiu.

MATERIALE ŞI METODE

Tehnica de perturbare a substratului unei reacţii enzimatice

Principala caracteristică a acestei noi tehnici descrisă de noi constă în iradierea unui strat fin şi omogen de substrat, sub formă de pulbere, urmată de evaluarea efectului acestei perturbări în reacţia enzimatică specifică. Etapa de iradiere a substratului este etapa critică a tuturor experimentelor de această natură şi, ca atare, sînt revelatoare următoarele aspecte. Puritatea substratului este necesară la grad analitic. Substratele sînt distribuite în strat subţire, pe discuri de material plastic. Deşi uniformitatea stratului de pulbere de substrat nu poate fi reprodusă exact în două experimente succesive, rezultatele înregistrate în cinetica reacţiei enzimatice nu sînt influenţate. Pentru a demonstra faptul că uniformitatea stratului nu este limitativă, s-au folosit şi straturi perfect uniforme de substrate, realizate prin solvarea substratului şi evaporarea ulterioară a solventului. Acest procedeu permite obţinerea unui film uniform de substrat, ce va fi apoi folosit în tehnica de perturbare (iradiere) ca şi stratul de pulbere.

Ceea ce pare esenţial în acest tip nou de experiment este că gradul de libertate translaţională al moleculelor nu este permis. Într-adevăr, acest aspect fizic important este argumentat şi de faptul că iradierea substratului în soluţie nu dă nici un rezultat, respectiv nici un efect asupra interacţiunii enzimă-substrat. Foarte interesant este însă efectul obţinut prin iradierea soluţiei de substrat îngheţate. În plus, trebuie menţionat că în fenomenul descris de noi nu este implicat un „dark effect", întrucît substratele iradiate în condiţiile menţionate şi substratele ţinute o lună în întuneric şi iradiate în întuneric dau rezultate similare.

Sursele de iradiere

Două tipuri de sursă de lumină au fost folosite pentru iradierea substratelor, deci pentru realizarea „perturbării" : 1) O lampă Hg de tip UV—IR 1, cu următoarele caracteristici tehnice : 220 V — 50 Hz, intensitatea curentului 1,31 A, 280 w. Lampa emite un spectru de linii în domeniile ultraviolet şi vizibil. Fluxul luminos este emis printr-o fantă de 1 × 3 cm, montată la 2,5 cm distanţă faţă de lampă ; 2) O lampă Phillips 73, BA 21 S (tungsten) cu următoarele caracteristici tehnice : 12 V, 70 w, emiţînd un spectru continuu în domeniul vizibil. Fluxul luminos este emis printr-o fantă circulară cu un diametru de 2 cm, montată la nivelul lămpii.

Condiţiile de iradiere

Toate iradierile necesare în cadrul tehnicii de perturbare a substratului au fost efectuate în aer, cu fasciculul luminos al sursei orientat perpendicular pe planul reprezentat de suprafaţa stratului de pulbere de substrat. S-a folosit atît lumină nepolarizată, cît şi polarizată. Pentru polarizarea luminii s-au folosit polaroizi Leybold-Messinstrumente, Germany. Pentru

a separa liniile de Hg alese în cadrul experimentelor cu lumină monocromatică, s-a folosit un set de filtre optice. Transmitanța și lățimea benzilor pentru aceste filtre sînt reprezentate schematic în figura 1.

Pentru o serie de experimente ce implicau și variația intensității luminii monocromatice și polarizate cu unghiul dintre polaroizi, s-au efec-

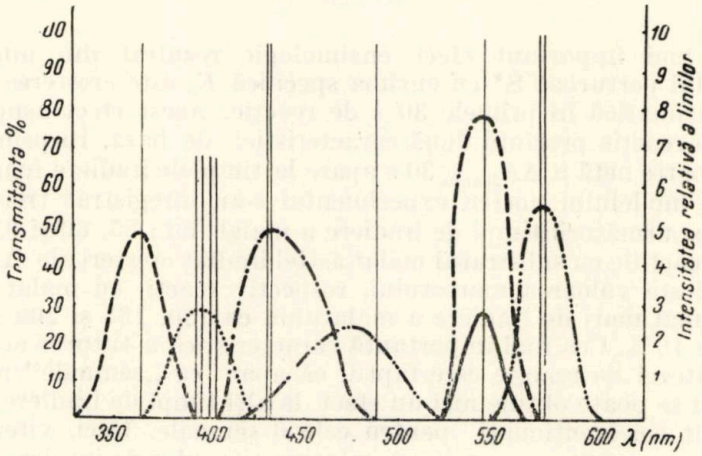


Fig. 1. — Linii din spectrul Hg al lămpii UV — IR 1 utilizată în experiențele de iradiere. Transmitanța procentuală pentru filtrele folosite în izolarea acestor linii.

— — — 366 nm Hg Mono; . . . . . 405 nm Hg Mono; — · — · 436 nm Hg Mono; — · · — 490 nm Hg Mono; ——— 546 nm Hg Mono (I); o o o 546 nm Hg Mono (II): — o — 577 nm Hg Mono.

tuat determinări ale iluminării la suprafața stratului de pulbere de substrat. Aceste determinări au fost făcute cu un IAP (Paris) — Luxmetru.

Evidențierea efectului substratului perturbat, prin reacția enzimatică

Tranziția S→S* este relevată prin intermediul reacției enzimatice specifice, a cărei cinetică se modifică. Astfel, enzima corespunzătoare se comportă ca un „sistem microfizic de măsură" care recunoaște și „măsoară" tranziția substratului S în substrat perturbat S*.

Tehnica de perturbare a substratului s-a aplicat la reacția malic dehidrogenazică. Toate experimentele s-au efectuat cu Na-malat cristalin (Sigma). Efectele iradierii Na-malatului asupra reacției enzimatice au fost determinate prin utilizarea malic dehidrogenazei din inima de porc, preparat comercial Mann Res. Lab. (activitate specifică 120 U/mg proteină). Mediul de reacție utilizat a fost următorul: Na-malat 64 μmoli, NAD 3 μmoli, 0,5 ml tampon hidrazină-glicină, pH 9,5 (0,4 M hidrazină — 1 M glicină) adus la volumul final de 3 ml cu apă bidistilată. Reacția a fost inițiată cu 3,75 μg enzimă, la 26°C și urmărită timp de 60 s, pe un spectrofotometru Beckman tip B. Citirile s-au făcut la fiecare 10 s. În aceste condiții, reacția enzimatică este perfect liniară timp de peste 120 s.

În unele experimente cu substrate iradiate se observă totuşi o curbare a înregistrării după 30 s. Din această cauză am folosit două tipuri de exprimare a rezultatelor : viteza iniţială de reacţie V_0 ca ΔA. min^{-1} şi $\Delta A/30$ s ca o măsură a tranziţiei $S \rightarrow S^*$.

REZULTATE

Cel mai important efect enzimologic rezultat din interacţiunea substratului perturbat S^* cu enzima specifică E_S este creşterea vitezei de reacţie enzimatică în primele 30 s de reacţie. Acest efect asupra vitezei iniţiale de reacţie prezintă două caracteristici de bază. În primul rînd, o creştere foarte netă a $\Delta A_{340nm}/30$ s apare la timpi de iradiere foarte precişi. În cadrul modelului nostru experimental s-au înregistrat trei asemenea creşteri, la următorii timpi de iradiere a malatului : 25, 60 şi 95 s. Se observă în reacţiile cu substratul malat astfel iradiat creşteri ale $\Delta A_{340nm}/30$ s cu 25% peste valoarea martorului, respectiv reacţii cu malat neiradiat. La timpi mai mari de iradiere a malatului, ca 130, 165 şi 200 s, se obţin creşteri de 16%. Cea mai importantă caracteristică a tuturor acestor creşteri ale vitezei de reacţie este faptul că apar ca „semnale" reale. Într-adevăr, nu se poate obţine nici un efect la alţi timpi de iradiere a substratului, decît cei menţionaţi pentru cele 6 semnale. Deci, viteza reacţiei enzimatice nu creşte progresiv cu valoarea timpului de iradiere a substratului, ci apar stimulări, respectiv creşteri nete ale vitezei de reacţie la valori fixe, bine determinate ale timpului de iradiere. În plus, semnalele astfel obţinute sînt delimitate de perioade fixe de 35 s (în timpul de iradiere a

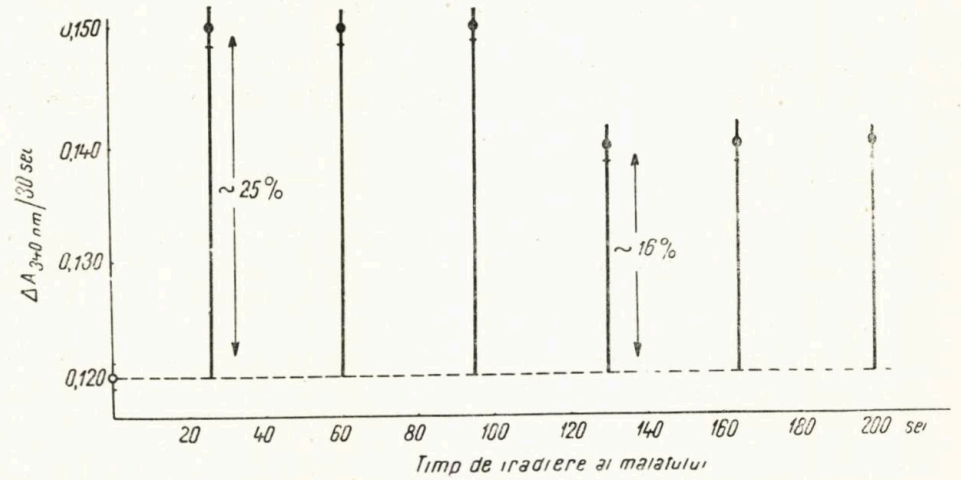


Fig. 2. — Stimularea reacţiei malic dehidrogenazei indusă cu substrat (malat) iradiat. Iradierea cu $\lambda = 546$ nm ; sursa de iradiere : lampa Hg. Înălţimea sursei de iradiere = 17 cm.

substratului). Nu mai apar semnale după 220 s de iradiere a substratului (fig. 2). În al doilea rînd, efectul perturbării substratului asupra vitezei iniţiale de reacţie se manifestă prin apariţia unei curbări clare a înregistrării reacţiei, ori de cîte ori acest efect este indus. Într-un mod foarte

interesant, toate iradierile substratului care nu induc efectul de stimulare nu modifică liniaritatea înregistrării. Cînd efectul apare, reacția enzimatică decurge cu o viteză crescută timp de aproximativ 30 s, după care se reia viteza de reacție a martorului (fig. 3). Din acest motiv, s-a ales ca mod de exprimare și ca unitate de măsură a tranziției S→S* induse prin iradiere,

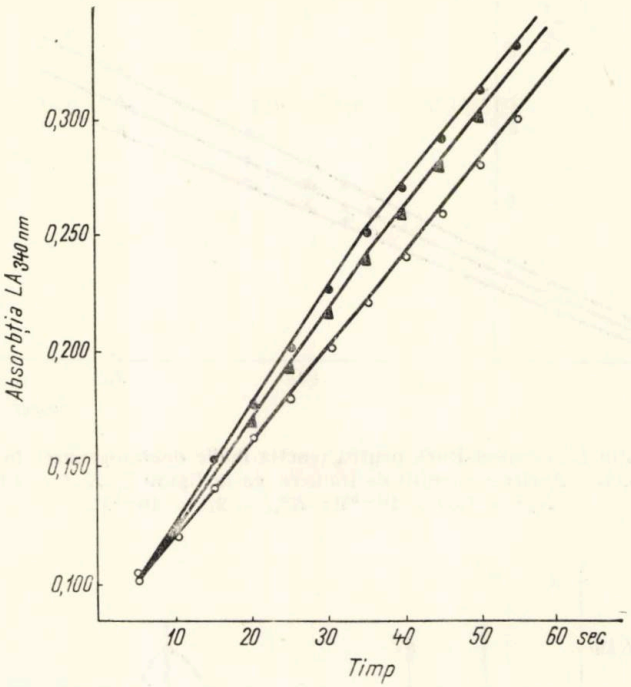


Fig. 3. — Reprezentarea grafică a reacției malic dehidrogenazei, efectuată în sensul malat→oxaloacetat.

o——o reacție martor (cu substratul malat neiradiat); ●——● primul semnal (substratul malat iradiat cu timpul IR corespunzător de 25 s); ▲——▲ al patrulea semnal (substratul malat iradiat cu timpul IR corespunzător celui de al patrulea semnal, respectiv 130 s).

valoarea $\Delta A/30$ s. Rezultatul cel mai important din punct de vedere cinetic, implicat în acest fenomen, este reprezentat de creșterea vitezei maxime V_{max} cu modificarea corespunzătoare a constantei Michaelis.

Argumentarea experimentală privitoare la primul semnal (corespunzînd unei valori de 25 s timp de iradiere a malatului) ce arată variația celor doi parametri $1/V_0$ și K_m este reprezentată în figura 4. În mod analog, pentru al patrulea semnal (corespunzînd unei valori de 130 s timp de iradiere a substratului — malat) variația celor doi parametri este prezentată în aceleași figuri, comparativ cu martorul (reacția cu malat neiradiat).

Un alt tip de argument experimental privește dependența inducerii tranziției S→S* de către anumiți parametri fizici. Astfel, un prim aspect fizic investigat de noi a fost dependența efectului de creștere a vitezei de reacție de lungimea de undă utilizată în experimentul de iradiere a substratului. Gradul maxim de tranziție S→S* se înregistrează la iradieri cu $\lambda = 546$ nm de la o sursă Hg (fig. 5 *A*). Cedarea S* în tranziția S→S*

este evident redusă cînd iradierile implică alte lungimi de undă în domeniul UV şi albastru sau roşu.

Acelaşi tip de rezultate se reproduce cînd este folosită lumina polarizată, cu diferite filtre, în acelaşi model experimental de perturbare a malatu-

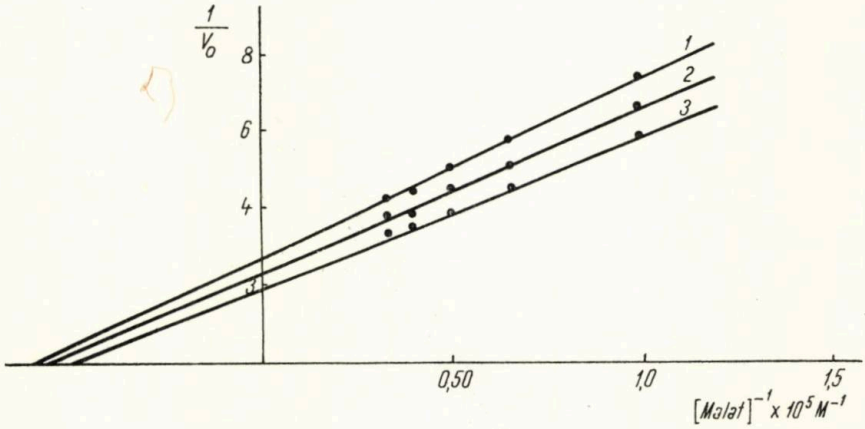


Fig. 4. — Plotul Lineveawer-Burk pentru reacţia malic dehidrogenazei în sensul malat → oxaloacetat. Aceleaşi condiţii de iradiere ca în figura 2. $K_m 1 = 1{,}64 \times 10^{-5}$M; $K_m{}^2 = 1{,}82 \times 10^{-5}$M; $K^3{}_m = 2{,}1 \times 10^{-5}$M.

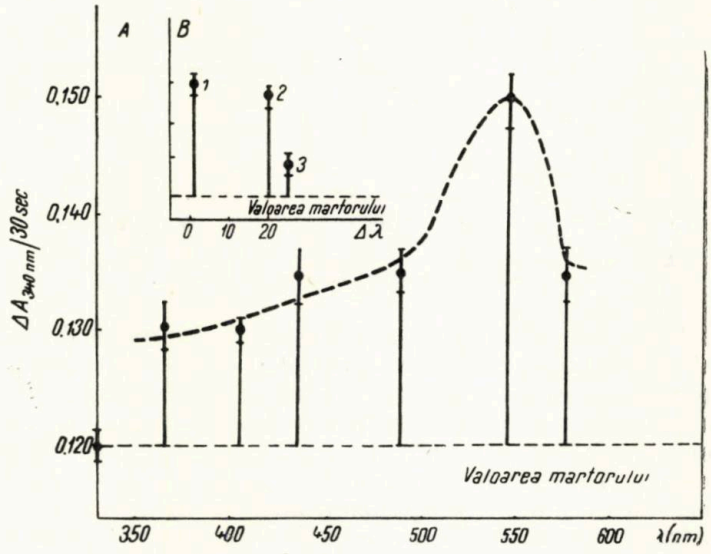


Fig. 5. — *A* — Amplitudinea primului semnal (exprimată ca $\Delta A/30$ s în reacţia malic dehidrogenazei efectuată cu malat iradiat 25 s) ca funcţie de lungimea de undă folosită în iradiere. *B*. — Producerea lui S* în tranziţia S→S*, obţinută în experimentul cu malat iradiat 25 s, ca funcţie de $\Delta\lambda$.

1 = sursa Hg, la înălţimea de 17 cm, cu filtre λ = 546 nm (I şi II); *2* = sursa tungsten, la înălţimea de 13 cm, cu filtrul λ = 546 nm (I); *3* = sursa tungsten, la înălţimea de 13 cm, cu filtrul = 546 nm (II).

lui ca substrat al reacției malic dehidrogenazice. Astfel, apare o dependență interesantă de $\Delta\lambda$, respectiv de lățimea benzii de iradiere incidente. Faptul că gradul tranziției $S \rightarrow S^*$ scade cu creșterea lățimii benzii de iradiere este reprezentat schematic în figura 5 *B*. Atunci cînd $\Delta\lambda \rightarrow \infty$, adică în condițiile iradierii cu lampa de tungsten fără filtre intermediare, efectul este complet abolit.

Un alt aspect fizic investigat de noi a fost dependența efectului de creștere a vitezei de reacție de intensitatea sursei de iradiere. Într-un prim tip de experiment imaginat în acest scop, intensitatea iradierii cu sursa Hg

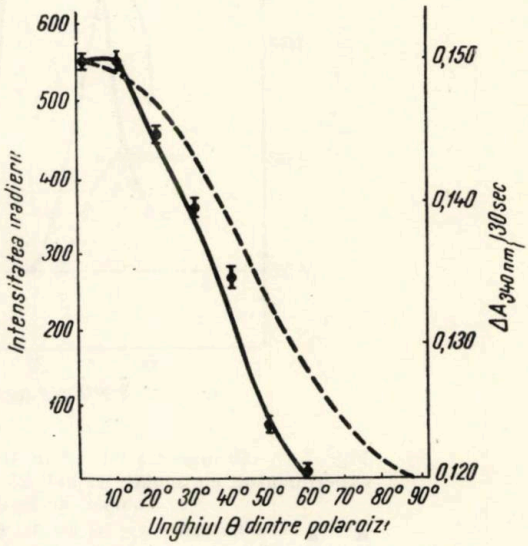


Fig. 6. — Producerea lui S* în tranziția $S \rightarrow S^*$, obținută în experimentul cu malat iradiat 25 s, cu lumină polarizată liniar ca funcție de unghiul θ dintre polaroizi. Sursa Hg, înălțimea 17 cm, filtrul $\lambda = 546$ nm (II).
– – – intensitatea iradierii; ● – ● – $\Delta A_{340nm}/30$ s.

s-a modulat prin variația unghiului dintre doi polaroizi, interpuși între fanta lămpii și pulberea de substrat. După cum reiese din figura 6, în acest caz tranziția $S \rightarrow S^*$ urmează variația intensității de iradiere, care este la rîndul ei, funcție de unghiul θ dintre cei doi polaroizi.

Într-un al doilea tip de experiment, iradierea s-a modulat prin variația înălțimii sursei luminoase față de stratul de pulbere de substrat. În acest caz, s-a obținut un rezultat total diferit, după cum se poate observa din figura 7. Iradiind substratul malat cu lumină de $\lambda = 546$ nm, se poate varia intensitatea iradierii în funcție de înălțimea sursei, ceea ce dă o serie de rezultate neașteptate. Astfel, apare necesară situarea într-un interval optim de înălțime a sursei între 14 — 22 cm, măsurat de la sursa de lumină, în cazul sursei Hg. Pentru lampa de tungsten, intervalul de înălțime este între 12 — 14 cm.

Un efect net se obține cu două tipuri de filtre $\lambda = 546$ nm I și II, cu rata de transmitere de 1/3, prezentînd în cazul sursei Hg absolut aceeași dependență de înălțime. Aceeași dependență a efectului față de înălțimea sursei de iradiere a fost investigată și cu lumina polarizată liniară. De asemenea, în acest caz apare necesară situarea într-un interval optim de înălțime, pentru producerea tranziției $S \rightarrow S^*$. Cu unghiuri θ diferite între cei doi polaroizi interpuși între sursa luminoasă și stratul de pulbere de

substrat se înregistrează profiluri similare ale dependenţei de înălţimea sursei de iradiere. Dar, în această situaţie, maximum de tranziţie S→S* se modifică după cum reiese din figura 6.

Un ultim aspect investigat în acest context a fost timpul de viaţă al stării perturbate a substratului, respectiv al stării S*. În acest scop s-a

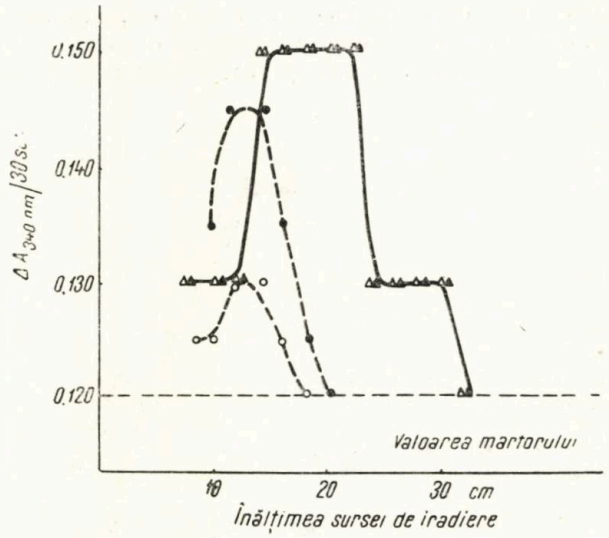


Fig. 7. — Producerea lui S* în tranziţia S→S*, obţinută în experimentul cu malat iradiat 25 s ca funcţie de înălţimea sursei de iradiere.

▲——▲ sursa Hg, filtrul ν = 546 nm (I); ●——● sursa tungsten, filtrul λ = 546 nm (I); △——△ sursa Hg, filtrul λ = 546 nm (II); ○——○ sursa tungsten, filtrul λ = 546 nm (II).

procedat la solvirea substratului iradiat în apă bidistilată, menţinut apoi la 30°C şi testat în reacţia enzimatică corespunzătoare, la fiecare 5 min. Scăderea cedării S* în tranziţia S→S* cu malatul iradiat 25 s şi respectiv 130 s este reprezentată în figura 8.

DISCUŢII

Rezultatele experimentale astfel obţinute prezintă o serie de implicaţii enzimologice majore. Creşterea vitezei reacţiei enzimatice care apare într-o fază iniţială, creştere indusă de substratele iradiate, precum şi curbarea înregistrării grafice, sugerează că tehnica de perturbare a substratului propusă de noi, induce două tipuri de „populaţii" de substrate. Acestea se transformă cu viteze diferite în produse de reacţie. Rezultatul cel mai neaşteptat este timpul de viaţă lung al stării S* induse prin iradiere (fig. 8). În mod evident, nici o metodă uzuală de chimie cuantică nu poate asigura o asemenea stabilitate. Dar, existenţa acestor două stări ale sub-

stratului S în cursul reacției enzimatice, ridică o serie de dificultăți de natură cinetică. Astfel, semnificația K_m-ului în tratamentul clasic Michaelis-Menten poate apărea diferită, implicație cinetică a cărei analiză mai detaliată nu constituie scopul acestui articol. Faptul că randamentul maxim de producere a lui S* în tranziția S→S* apare la lumina monocromatică cu $\lambda = 546$ nm, pare să indice că pentru acest tip de radiație electromag-

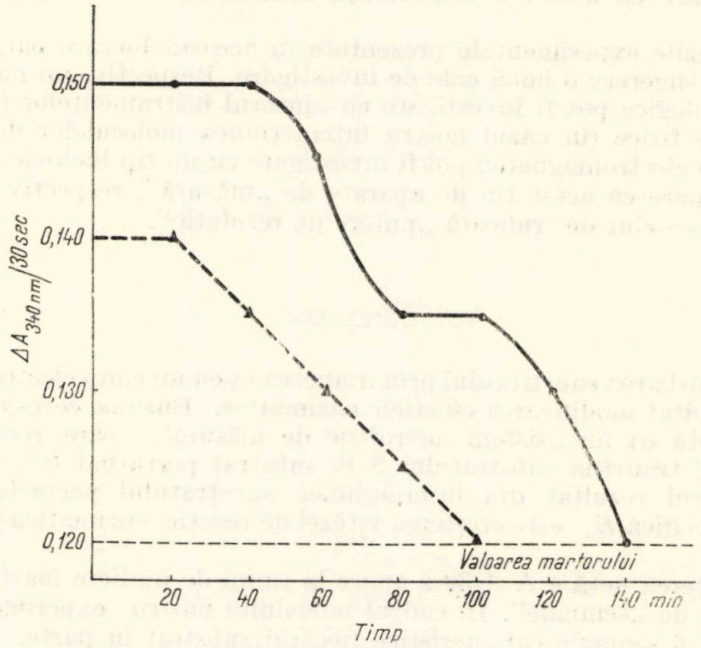


Fig. 8. — Cinetica stingerii stării S*, indusă de malatul iradiat, solvit și ținut la 30°C în soluție. Sursa Hg, înălțimea 17 cm, filtrul $\lambda = 546$ nm (II).

●—● primul semnal (25 s iradiere); ▲—▲ al patrulea semnal (130 s iradiere). Determinările activității malic dehidrogenazei s-au efectuat la fiecare 20 min.

netică este caracteristic un tip de „cuplare rezonantă". În acest context este important de observat că deși iradieri cu diferite lungimi de undă dau energii fotonice diferite și fluxuri energetice diferite, semnalele apar la aceiași timpi de iradiere. Pe de altă parte, randamentul cuantic de producere a lui S* în tranziția S→S*, specificat prin viteza reacției enzimatice, pare să depindă de lungimea de undă λ utilizată în perturbarea substratului (fig. 5 *A*). Considerăm aceasta drept primul paradox. Creșterea randamentului de producere a lui S* în tranziția S→S* pe măsură ce se îngustează lățimea benzii de iradiere poate reprezenta un argument experimental. Acesta se situează foarte bine în cadrul argumentării lui Rhodes [6], privitoare la abordarea tranzițiilor neradiative pe baza stărilor staționare.

În privința dependenței randamentului de producere a lui S*, în tranziția S→S*, de înălțimea sursei de iradiere, apare clar (fig. 7) că același efect se obține cu două filtre diferite (I și II) pentru $\lambda = 546$ nm, deși la nivelul optim de înălțime a sursei, raportul intensităților respectivelor iradieri este de 1/3. Pe de altă parte, producerea de S* în tranziția S→S*

este în mod evident, dependentă de variaţia intensităţii de iradiere,ca funcţie de unghiul θ dintre doi polaroizi (fig. 6). Considerăm acesta drept al doilea paradox. Acest tip de experiment sugerează că, în acest caz, în inducerea tranziţiei S→S* apare un tip special de interacţiune a cîmpului electromagnetic cu moleculele de substrat. Această nouă interacţiune apare ca fiind independentă de intensitatea iradierii. Acest rezultat experimental apare ca avînd o importanţă fundamentală şi implicaţii fizice extensive.

Dovezile experimentale prezentate în această lucrare par, de asemenea, să sugereze o nouă cale de investigare. Respectiv, nu numai fenomenele biologice pot fi investigate cu ajutorul instrumentelor fizice, ci şi fenomenele fizice (în cazul nostru interacţiunea moleculelor de substrat cu un cîmp electromagnetic) pot fi investigate cu un tip biologic de instrument. Se pare că acest tip de aparate de „măsură", respectiv enzimele, posedă o deosebit de ridicată „putere de rezoluţie".

CONCLUZII

Perturbarea substratului prin iradierea sa cu un cîmp electromagnetic are ca rezultat modificarea cineticii enzimatice. Enzima corespunzătoare se comportă ca un „sistem microfizic de măsură", care recunoaşte şi „măsoară" tranziţia substratului S în substrat perturbat S*.

Efectul rezultat din interacţiunea substratului perturbat S* cu enzima specifică E_S este creşterea vitezei de reacţie enzimatică în primele 30 s.

Creşterea netă a $\Delta A/30$ s apare la timpi de iradiere foarte precişi, sub formă de „semnale". În cadrul modelului nostru experimental s-au înregistrat 6 semnale caracteristice fiecărui substrat în parte.

Efectul perturbării substratului asupra vitezei iniţiale de reacţie se manifestă prin apariţia unei curbări clare a înregistrării reacţiei.

S-a evidenţiat, de asemenea, o dependenţă a efectului de creştere a vitezei de reacţie de lungimea de undă utilizată în experimentul de iradiere a substratului, de intensitatea şi de înălţimea sursei de iradiere.

Acest nou tip de experiment sugerează că în inducerea tranziţiei S→S* apare un tip special de interacţiune a cîmpului electromagnetic cu moleculele de substrat.

Prezentată la redacţie la 12 aprilie 1971

Laboratorul central de biochimie, Spitalul clinic Fundeni, Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. S. Comoroşan, P. Murgoci, Bull. Math. Biophysics, **31**, 623 (1969).
2. S. Comoroşan, S. Vieru, D. Şandru, Int. J. Radiat. Biol., **17**, 105 (1970).
3. S. Comoroşan, Nature, **227**, 64 (1970).
4. S. Comoroşan, S. Vieru, D. Crişan, D. Şandru, P. Murgoci, Physiol. Chem. Physics, **3**. 1 (1971).
5. S. Comoroşan, S. Vieru, D. Crişan, D. Şandru, P. Murgoci, E. Alexandrescu, Physiol. Chem. Physics **3**, 103, (1971).
6. W. Rhodes, B. R. Henry, M. Kasha, Proc. Natl. Acad. Sci., **63**, 31 (1969).

THE INTERACTION BETWEEN ENZYMES AND THEIR IRRADIATED SUBSTRATES

SUMMARY

We present in this paper a new approach to the study of some physical phenomena involved in the interaction between an electromagnetic field and the molecules of an enzymic substrate. This new type of investigation implies the utilization of a biological instrument i. e. the enzymic macromolecule. Thus, the enzymic substrates were irradiated and an $S \rightarrow S^*$ transition was induced. The effects of this transition on the enzymic reaction rate were determined. The reaction rate enhancement thus induced and its dependence on a series of physical parameters as : the radiation wavelength, irradiation intensity, light polarization, were investigated. A particular type of $S \rightarrow S^*$ transition was recorded. Its main characteristic was found to be an anomalously long life-time.

St. cerc. biochim., **14**, 4, 457–462 (1971)

J. GARETH MORRIS, *A Biologist's Physical Chemistry* (*Chimie fizică pentru biologi*), Edward Arnold Ltd., Londra, 1970, 367 p.

Lucrarea face parte dintr-o serie de cărți destinate studenților, cuprinse în seria — „Contemporary Biology" — (Biologia contemporană) —, avînd ca editori pe E. J. W. Barrngton și A. J. Willis. Ea răspunde unor necesități actuale : datorită progreselor revoluționare ale biologiei celulare și subcelulare, unul din scopurile biologiei contemporane este descrierea proceselor vitale în termeni fizico-chimici. Fără înțelegerea bazelor chimiei fizice, studenții în biologie nu vor putea depăși stadiul descriptiv al studierii plantelor și animalelor.

Autorul își propune să ajute la înțelegerea acelor părți din chimia fizică, care, deși în legătură imediată cu biologia, sînt de obicei prost înțelese. Pentru aceasta, el se folosește de un limbaj matematic minim, explicat foarte clar în primul capitol (fracții, puteri, logaritmi, serii, reprezentări grafice); înțelegerea ecuațiilor principale este ajutată de descrierea în cuvinte a sensului lor și prin exemple din biologia celulară. Astfel, capitolul despre comportarea gazelor conține și măsurarea schimburilor gazoase ale sistemelor biologice, prin manometrie, cu descrierea aparatului Warburg și a modului de calcul al constantei aparatului și a consumului de oxigen. Capitolul despre proprietățile soluțiilor apoase tratează și comportamentul osmotic al celulelor. Capitolul despre acizi, baze și sisteme tampon este urmat de altul despre semnificația biochimică a pH-ului (efectul pH-ului asupra reacțiilor metabolice, ionizarea aminoacizilor și a proteinelor în funcție de pH). Deosebit de clar sînt explicate bazele termodinamicii, echilibrul chimic și reacțiile cuplate, urmate de aplicarea termodinamicii în biochimie : determinarea caracteristicilor termodinamice ale unei reacții biochimice, compușii macroergici și reacțiile cuplate implicînd ATP. De asemenea, capitolul despre cinetica reacțiilor chimice este urmat de unul despre cinetica reacțiilor enzimatice, tratat în lumina ultimelor date. În sfîrșit, ultimul capitol, consacrat oxidoreducerilor, tratează și problema transportului electronilor prin lanțul respirator.

Lucrarea se adresează în special studenților din primii doi ani ai facultăților de biologie, medicină, biochimie, dar poate fi foarte utilă și cercetătorilor din aceste domenii, mai ales că se indică la bibliografie cîteva lucrări de chimie fizică, biochimie și biologie celulară, pentru completarea cunoștințelor explicate.

În ansamblu, lucrarea poate fi considerată o reușită a editurii Edward Arnold, care asigură lucrării condiții grafice remarcabile.

C. Benga
Catedra de biochimie,
Institutul de medicină și farmacie, Cluj

R. GRUBB, *The Genetic Markers of Human Immunoglobulins* (*Markerii genetici ai imunoglobulinelor*), Springer Verlag, Berlin–Heidelberg — New York, 1970, 152 p.

Studiul de față aduce date cu privire la diferențierea și controlul purității imunoglobulinelor cu ajutorul markerilor lor genetici, care permit să se obțină informații inaccesibile pe alte căi.

Lucrarea este împărțită în 7 capitole.

În capitolele I și II este prezentată o privire generală asupra structurii imunoglobulinelor și a markerilor lor genetici. De asemenea sînt arătate tehnicile imunologice prin care s-a demonstrat prezența acestora, precum și nomenclatura lor, recomandată de către Organizația Mondială a Sănătății.

În capitolul III se analizează relațiile dintre lanțurile polipeptidice ale imunoglobulinelor și factorii genetici, la om. Toți factorii Gm și Am cunoscuți pînă în prezent au fost găsiți a fi pe lanțul H, în regiunea fragmentelor Fc sau Fd. În contrast cu factorii Gm, cei trei factori Inv se găsesc în exclusivitate pe lanțul L. Se face de asemenea corelarea între subclasele imunoglobulinelor și factorii Gm, corelarea lor cu substituția aminoacizilor și cu structura cuaternară a proteinei.

În capitolul IV sînt tratate relațiile de legătură între sistemul Gm și alte sisteme polimorfe, distribuția factorilor Gm pe moleculele Ig într-un anumit individ, precum și problema segmentului cromozomial Gm, ca un component al diferitelor locusuri, fiecare fiind legat de o anumită subclasă de imunoglobuline.

În capitolul V se tratează probleme cu privire la auto-anticorpi, specificitatea și funcțiile lor, legătura dintre factorii genetici Ig și toleranța imunologică.

În capitolul VI autorul se ocupă de polimorfismul imunoglobulinelor, ca exemplu de diferențiere moleculară în macroorganisme, și discută filogenia și ontogenia polimorfismului lor, dezvoltarea factorilor genetici în timpul vieții extrauterine, ca și relațiile dintre factorii genetici ai mamei și copilului, la naștere.

Capitolul VII se ocupă cu selecția și controlul genetic al structurii imunoglobulinelor, în diferitele etape ale biosintezei lor.

După capitolul VII urmează o compilație foarte utilă a datelor descriptive cu privire la toți factorii genetici ai imunoglobulinelor umane. Lucrarea se încheie cu o listă bibliografică de 572 titluri și un index de subiecte.

Prin bibliografia foarte bogată, prin originalitatea și claritatea expunerii, lucrarea va putea fi de un real folos biochimiștilor, medicilor și biologilor.

Lucia Buzilă
Institutul de biochimie,
București

R. SÜSS, V. KINZEL, J. D. SCHRIBNER, *Krebs, Experimente und Denkmodelle* (*Cancerul, experiențe și concepții*), Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1970, 257 p.

Problema cancerului, văzută prin prisma originală a unor sisteme de gîndire și experimentări, așa cum o redau autorii acestei lucrări, prezintă un deosebit interes.

Volumul cuprinde 16 capitole mari și un mic glosar morfologic, pentru toți cei ce au o altă specialitate decît medicina.

În introducere, autorii arată că investigațiile în domeniul cancerului implică o cercetare modernă, multilaterală, de ordin patologic, biochimic, fizic, toxicologic, virusologic și chimic. Problema diferențierii celulare rămîne punctul central al studiului. Or, aceste cercetări de di-

verse aspecte converg spre problema centrală numai în cazul unei colaborări cunoscute şi organizate.

Primul capitol tratează carcinogeneza datorită substanţelor de tipul hidrocarburilor ciclice. Sînt redate modele tumorale experimentale, obţinerea 3,4-benzpiranului, producerea de tumori ale pielii de către hidrocarburile policiclice, teoria mecanismului carcinogenezei sub acţiunea acestor hidrocarburi (de tipul fenantrenului), legarea acestor hidrocarburi de proteine, proteinele ca regulatori de creştere, reactivitatea hidrocarburilor în speţă cu DNA.

Cel de-al doilea capitol, intitulat „Aminele aromatice de activarea reacţiilor", tratează acţiunea carcinogenă a unora dintre amine şi condiţiile în care acestea devin carcinogenetice. Se arată că N.-hidroxi-esterul provenit de la 2-acetil-amino-fluoren este ultima treaptă de reacţie în carcinogeneză şi că aminele aromatice sînt legate de proteine, de preferinţă de h_2-proteine.

Capitolul 3 priveşte aspectul chimic al carcinogenezei, respectiv aspectul cantitativ, curbele de dozare. Se menţionează că efectele cancerigene sînt ireversibile, cancerogeneza este un proces accelerat, neexistînd doze carcinogenetice subliminale. În finalul capitolului se subliniază importanţa biologică a acestei acceleraţii.

Capitolul 4 tratează ipotezele chimice ale carcinogenezei şi detaliază aspecte privind carcinogeneza şi fenomenul de iritaţie-excitaţie.

Capitolul 5 se referă la factorii gazdă existenţi la naşterea tumorilor. În speţă se arată, printre altele, că produşii toxici de reacţie reprezintă un pericol de cancerizare, că celulele tumorale pot exista în organismul gazdă, într-o stare latentă, ani îndelungaţi. Se subliniază paradoxul constituit de influenţa factorilor alimentari, precum şi dependenţa hormonală de creşterea tumorilor. În fine, metastazele trebuie explicate atît cu ajutorul teoriei biochimice, cît şi al teoriilor mecanocirculatorii.

Capitolul 6 trece în revistă factorii regulatori ai creşterii tisulare, amintind de unii represori mai importanţi ai acestui fenomen.

Capitolul 7 tratează carcinogeneza legată de arhitectura celulară, respectiv de organitele celulare. Se remarcă DNA-zele lizozomale, ca fiind carcinogene. De asemenea, carcinogeneza este privită prin perspectiva membranei.

Capitolele 8 şi 9 se referă la mitocondrii, în legătură cu teoria lui Warburg şi, respectiv, la imunologia tumorilor. Este vorba de transplantarea tumorilor, de existenţa sau inexistenţa antigenilor tumor-specifici, chiar şi în cazul tumorilor induse virotic.

În capitolul următor se face un scurt istoric al virusilor tumorali, însoţit de clasificarea respectivă.

Capitolul 11 priveşte DNA-tumoralvirusii în culturi de ţesuturi. Autorii discută transformarea şi moartea celulelor în cazurile în speţă, mascarea virusilor, prezenţa antigenilor virus-specifici şi a acidului ribonucleic virus-specific. Se arată, de asemenea, că DNA-tumoralvirusul conţine puţine gene, punîndu-se întrebarea care gene sînt capabile de transformări.

În cel de al 12-lea capitol se discută problema cancerului prin prisma genetică. Ideea principală care se desprinde este corelarea activităţii mutagene cu cea carcinogenă.

În continuare, capitolul 13 tratează legătura dintre DNA şi carcinogeneză.

În fine, în următoarele două capitole se prezintă unele modele chimioterapice ale tumorilor, precum şi principiilor de formare a tumorilor.

Lucrarea se încheie cu un capitol sub formă de dialog, privind cele mai diferite teorii.

Mioara Cârsteanu
Institutul de biochimie,
Bucureşti

ALBERT L. LATNER, Andrew W. SKILLEN, *Isoenzymes in biology and medicine* (*Izoenzimele în biologie și medicină*), Academic Press, Londra — New York, 1968, 289 p.

În ultima vreme cercetările privitoare la izoenzime au luat o considerabilă dezvoltare și au dobîndit o deosebită importanță pentru biologia și medicina modernă. Cu toate acestea, există încă prea puține publicații privitoare la acest domeniu. Astfel, această monografie, în care se prezintă tot ce a apărut mai important în literatură privitor nu numai la studiul izoenzimelor, ca atare, în organismele umane, animale, insecte, plante, ciuperci, protozoare, alge și bacterii, ci și la structura chimică, rolul fiziologic și biochimic, precum și la folosirea lor în cercetările de genetică, onto- și filogenie, vine să completeze literatura de specialitate cu o operă elaborată minuțios și deosebit de competent.

Lucrarea debutează cu o introducere în care se face un scurt istoric al cercetărilor asupra izoenzimelor, paralel cu o discuție, de asemeni în perspectivă istorică, a noțiunii de izoenzimă.

Următoarele trei capitole sînt dedicate izoformelor oxido-reductazelor, transferazelor și, respectiv, hidrolazelor. Pentru fiecare izoenzimă se descriu, în măsura în care există date experimentale, distribuția în diferite organisme și, eventual, organe ale acestora, proprietățile chimice (structura subunităților), fizico-chimice și imunologice, sensibilitatea la inhibitori, cinetica etc.

Capitolul V tratează despre unele aspecte fiziologice și rolul metabolic al izoenzimelor. Fără ca datele experimentale să se fi putut uni într-o teorie unitară a rolului izoenzimelor în metabolism și procesele fiziologice, se arată că modul de comportare al diferitelor izoforme diferă sensibil în raport cu structura lor moleculară, cu condițiile de mediu (temperatură, pH, concentrație a substratului ș. a.) sau cu locul de acțiune (citoplasmă, mitocondrii), aceste proprietăți determinînd și mecanismele prin care acționează ca factori de reglare (oxido-reducere, feed-back, represie ș. a.).

Studii asupra controlului și variației genetice a compoziției izoenzimatice sînt discutate într-un capitol care se referă numai la om și mamifere. Principalele sisteme studiate sînt LDH, glucozo-6-fosfat-, izocitrat- și fosfogluconat dehidrazele, fosfatazele acide și alcaline, fosfoglucomutaza și unele kinaze și esteraze.

În continuare, un scurt dar consistent capitol tratează problema onto- și filogeniei izoenzimelor, sistemele cele mai bine studiate fiind lactat- și malat dehidrazele, precum și unele esteraze.

Izoenzimele insectelor, plantelor superioare, cupercilor și bacteriilor fac obiectul unui capitol special. Este de remarcat că în cazul plantelor superioare se prezintă și unele date privitoare la influența unor agenți patogeni asupra spectrului enzimatic al plantelor parazitate.

Un capitol deosebit de interesant, în special sub raport practic, este cel privitor la folosirea izoenzimelor în medicina clinică. Nu este vorba numai de numeroasele observații relative la eficiența studiilor asupra izoenzimelor în legătură cu problemele ce se pun laboratorului clinic, ci, mai ales, de folosirea analizei spectrului izoenzimatic (în special LDH-ul și fosfatazele), într-o serie mereu crescîndă de boli, printre care cele ale inimii și ficatului sînt cele mai bine studiate. Cercetările recente asupra izoenzimelor serice indică perspective certe ale folosirii analizelor enzimologice în diagnoza clinică.

Ultimul capitol este dedicat metodelor și tehnicilor cu ajutorul cărora izoenzimele pot fi cercetate sau folosite în practică. Dintre acestea, cele mai amănunțit descrise sînt tehnicile de separare, metodele de demonstrare a activității enzimatice și tehnicile imunologice.

Monografia se încheie cu o bogată bibliografie, suplimentară cu un apendix conținînd bibliografia mai importantă apărută după predarea textului la tipar, cu un index de autori și unul de subiecte.

Lucrarea se adresează biochimiştilor şi biologilor din sectorul de cercetare şi din laboratoarele clinice, precum şi altor specialişti din domenii învecinate, într-un stil clar, concis, elegant şi precis. Materialul este prezentat în condiţii grafice deosebite, lectura lui este foarte plăcută.

V. Eşanu
Institutul de cercetări pentru protecţia plantelor, Bucureşti

New Aspects of Storage and Release Mechanisms of Catecholamines (*Noi aspecte ale mecanismelor de acumulare şi eliberare a catecolaminelor*), editori H. J. SCHUMANN şi G, KRONBERG, *Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York*, 1970, 282 p., 116 fig., Index de autori şi Index de subiecte,

Publicarea comunicărilor prezentate în cadrul simpozionului Bayer asupra catecolaminelor îşi găseşte justificarea în importanţa acestui domeniu de cercetare fundamentală, în legătură directă cu farmacologia aplicată.

Materialul prezentat la simpozion a fost organizat în cinci secţii, dintre care primele trei tratează cîteva probleme mai importante ale mecanismelor de acumulare şi eliberare a catecolaminelor, ca de exemplu : originea şi transportul granulelor adrenergice ale nervului (secţia 1), mecanisme de eliberare a mediatorului, cu referire specială la problema exocitozei (secţia 2) şi simpatectomie chimică (secţia 3) ; cea de-a patra secţie tratează despre efectele medicamentelor asupra absorbţiei şi eliberării de catecolamine, iar cea de-a cincea secţie cuprinde discuţii generale.

Fiecare din comunicările prezentate în cadrul secţiilor este însoţită de discuţiile purtate pe marginea subiectelor tratate, ceea ce ajută la sublinierea problemelor mai importante şi la completarea lor.

Datele experimentale sînt elegant şi cu claritate prezentate, prin tabele, diagrame şi scheme, şi completate cu numeroase fotografii de microscopie electronică şi de fluorescenţă. Se remarcă, de asemenea, prezentarea grafică deosebită, calitatea clişeelor alb-negru sau color.

Lucrarea prezintă un interes deosebit pentru medici, farmacologi şi biochimişti.

Olguţa Macovschi
Facultatea de farmacie
I. M. F., Bucureşti

Protein Sequence Determination (*Determinarea secvenţelor proteice*), Editat de SAUL B. NEEDLEMAN, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1970, 345 p.

Determinarea secvenţelor proteice — al 8-lea volum din seria *Biologie moleculară, biochimie şi biofizică* — este o prezentare de tehnici şi metode de lucru. Editorul şi autorii — 11 — şi-au propus să arate cititorului „cum" trebuie să lucreze atunci cînd cercetează aminoacizii

din proteine şi au redus, în mod voit, la minimum, consideraţiile teoretice; pentru cel interesat, însă, şi în această latură a problemelor, indicaţiile bibliografice sînt ample şi la zi.

După un prim capitol de consideraţii generale, cel de-al doilea este dedicat caracterizării fizice a moleculei proteice — masa, sarcina, dimensiunile — şi procedeele analitice utilizate pentru obţinerea purităţii şi omogenităţii proteinelor. Capitolul 3 oferă interpretarea analizei grupărilor terminale — amino şi carboxil — atît în cazurile relativ simple, cît şi în cazul existenţei sistemelor cu mai multe lanţuri.

Analiza compoziţiei aminoacizilor prin cromatografie pe coloană de schimbători de ioni şi cromatografie în gaz este expusă în capitolele 4 şi 5. Conform cu mersul normal al analizei, capitolul 6 prezintă, în mod critic, metodele de fracţionare a proteinelor în grupări de peptide, mai scurte, şi posibilităţile de separare a acestora. Identificarea aminoacizilor specifici din peptide, ca şi, în general, din proteinele intacte, este descrisă în capitolul 7. În felul acesta se obţine ansamblul de informaţii necesare pentru stabilirea secvenţelor de aminoacizi din peptide; capitolul 8 expune în detaliu procedeele prin care se realizează aceasta.

Reconstituirea secvenţei primare a proteinelor originare este posibilă în momentul în care este cunoscută secvenţa din fiecare membru a cel puţin două serii separate de peptide; procedeele clasice, ca şi programele existente astăzi pentru folosirea computerelor în acest scop sînt descrise în capitolul 9.

Ultimul capitol al lucrării expune procedeele de sinteză a peptidelor, oferind astfel bazele pentru confirmarea, cel puţin parţială, a analizei proteinelor.

Prin articolele pe care le conţine şi prin referinţele bibliografice, lucrarea dă informaţii deosebit de utile cercetătorului din acest domeniu al biochimiei.

Sanda Rădulescu
Institutul de biochimie,
Bucureşti

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici ca : Viaţa ştiinţifică, în care prin note scurte sînt aduse la cunoştinţa cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc., Recenzii — în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea aceloraşi date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc., se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie : str. Docenţilor nr. 20, Bucureşti 63, Sectorul I.

1971 NOV

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

E. MACOVSCHI, *Biostructura*, 1969, 258 p., 18,50 lei.

M. ŞERBAN şi D. COTARIU, **Biochimia contracţiei musculare**, 1970, 240 p., 20,50 lei.

R. PORTOCALĂ şi L. POPA, **Acizii ribonucleici şi virali**, 1966, 375 p. + 8 pl., 26 lei.

M. G. BALŞ, **Imunofluorescenţă şi aplicaţiile ei în inframicrobiologie**, 1966, 285 p., 18 pl., 27 lei.

ION CANTACUZINO, **Opere alese, Œuvres choisies**, 1965, 687 p., 44 lei.

* * * **OMAGIU acad. prof. RALUCA RIPAN**, 1966, 628 p. + 2 pl., 50 lei.

La revue „Studii şi cercetări de biochimie" paraît 4 fois par an. Le prix d'un abonnement annuel est de $ 5 — Toute commande à l'éntrager sera adresée à Intreprinderea de comerţ exterior — —LIBRI, Boite postale 134 — 135 Bucarest, Roumanie ou à ses reprèsentans à l'étranger, En Roumanie, vous pourrez vous abonner par les bureaux de poste ou chez votre facteur.

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 14, Nr. 4, p. 357—462, BUCUREŞTI, DECEMBRIE, 1971

I. P. „Informaţia" — c. 2796

43816

Lei 20.—